

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



**Vliv zvýšené koncentrace CO₂ a ozáření na kvantitativní
parametry mezofylových buněk smrku ztepilého**

The effect of elevated CO₂ concentration and irradiation
on quantitative parameters of mesophyll cells of Norway spruce

Diplomová práce

Zuzana Kubínová

Praha 2010

Školitelka diplomové práce:

doc. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D., Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK

Konzultantky diplomové práce:

Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D. Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK

RNDr. Lucie Kubínová, CSc., Oddělení biomatematicky, Fyziologický ústav AV ČR

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením doc. RNDr. Jany Albrechtové, Ph.D. a za konzultace Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D. a RNDr. Lucie Kubínové, CSc. a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze, dne

Zuzana Kubínová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat paní docentce Janě Albrechtové, Zuzce Lhotákové a Dr. Lucii Kubínové, za velkou podporu a cenné rady při psaní této práce.

Můj velký dík také patří panu Prof. RNDr. Ing. Michalovi V. Markovi, DrSc., panu Mgr. Otmarovi Urbanovi, PhD. a paní Mgr. Mirce Šprtové, PhD. a dalším pracovníkům Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR, v.v.i. za poskytnuté výsledky měření fotosyntetických parametrů a za možnost použít pro tuto práci vzorky odebrané z jejich experimentálního stanoviště.

Dále děkuji všem členům Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK a všem pracovníkům oddělení Biomatematicky Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za vstřícný přístup a příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě děkuji všem členům mé rodiny, zejména mé sestře a všem mým prarodičům, kteří mě podporovali a povzbuzovali při psaní této práce.

Práce byla vypracována v rámci projektu GA ČR č. P501/10/0340 s názvem „Vliv zvýšené koncentrace CO₂ a ozáření na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních“ a dále byla podpořena grantem MŠMT LC 06063 s názvem „Fluorescenční mikroskopie v biologickém a lékařském výzkumu“.

Obsah

Obsah	6
Seznam použitých zkratk	7
Abstrakt	8
Abstract	9
1. Úvod	10
1.1 Cíle práce a hypotézy	11
2. Literární přehled	13
2.1 Změny v koncentraci CO ₂ v atmosféře Země a úloha rostlin v globálním koloběhu uhlíku	13
2.2 Metody studia vlivu zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny	15
2.3 Vliv faktorů prostředí na anatomické a fyziologické vlastnosti listů a jehlic	16
2.3.1 Vliv ozáření na listy a jehlice	16
2.3.2 Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny	18
2.3.2.1 Hlavní vlivy zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny	18
2.3.2.2 Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na anatomii listů a jehlic	23
2.3.3 Společný vliv koncentrace CO ₂ a ozáření na fyziologické vlastnosti jehlic	25
2.4 Metody pro odhad počtu chloroplastů v buňkách a listech	27
2.4.1 Způsob výběru vzorků a použitá metoda ovlivňuje výsledky měření	27
2.4.2 Počítání chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů	29
2.4.3 Počítání chloroplastů v izolovaných roztačených mezofylových buňkách	29
2.4.4 Další metody počítání chloroplastů v celých izolovaných mezofylových buňkách	31
2.4.5 Počítání chloroplastů v mezofylových buňkách z 2D řezu	31
3. Materiál a metody	33
3.1 Experimentální stanoviště Bílý Kříž	33
3.1.1 Lokalita stanoviště	33
3.1.2 Lamelové sféry	33
3.1.3 Porost	35
3.2 Pracovní postup a použité metody	35
3.2.1 Odběry vzorků	35
3.2.2 Snímání obrazových dat konfokálním mikroskopem	36
3.2.2.1 Příprava preparátů a nastavení mikroskopu	37
3.2.2.2 Postup snímání mikroskopem	37
3.2.3 Analýza získaných obrazových dat	38
3.2.3.1 Délka jehlice, odhad objemu jehlice a mezofylu a objemového podílu mezofylu	38
3.2.3.2 Odhad hustoty mezofylových buněk a chloroplastů v jehlici a v mezofylu, odhad počtu chloroplastů na mezofylovou buňku, odhad objemu mezofylových buněk	40
3.2.4 Měření fotosyntetických parametrů	42
3.2.5 Použité statistické metody	42
4. Výsledky	43
4.1 Vypracování metodiky pro zjištění nevychýleného odhadu hustoty chloroplastů a buněk v mezofylu jehlic s použitím metody disektoru	43
4.2 Metoda odhadu objemu jehlice	44
4.3 Anatomické charakteristiky slunných a stinných jehlic pod vlivem zvýšené koncentrace CO ₂	45
4.3.1 Anatomický popis jehlic, řezů, rozdíl tvaru na řezu slunnými a stinnými jehlicemi	45
4.3.1 Kvantitativní analýza	45
4.4 Fotosyntetické charakteristiky slunných a stinných jehlic pod vlivem zvýšené koncentrace CO ₂	52
4.5 Porovnání použití metody disektoru a jiných metod	54
5. Diskuse	55
5.1 Diskuse použitých metod	55
5.1.1 Zhodnocení dosavadních metod počítání chloroplastů	55
5.1.2 Princip systematicky rovnoměrně náhodného výběru	56
5.1.3 Výhody použité metody a časová efektivita měření	58
5.2 Porovnání anatomických a fotosyntetických charakteristik jehlic	59
5.3 Vyhodnocení pravdivosti hypotéz	63
5.4 Přínos práce, začlenění výsledků do širšího kontextu, směřování dalšího výzkumu	64
6. Souhrn	65
6.1 Metodické závěry	65
6.2 Experimentálně ekofyziologické závěry	65
7. Seznam citované literatury	66

Seznam použitých zkratk

- AC ambient concentration, normální atmosférická koncentrace CO₂
- A_{max} světlem saturovaná rychlost asimilace CO₂
- AQE zdánlivá kvantová účinnost
- ATP adenosintrifosfát
- AV ČR Akademie věd České republiky
- [CO₂] koncentrace oxidu uhličitého
- EC elevated concentration, zvýšená koncentrace CO₂
- EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová
- ETR rychlost elektronového transportu
- FACE free air CO₂ enrichment, systém obohacování vzduchu oxidem uhličitým pro experimentální účely
- GA ČR Grantová agentura České republiky
- LAI leaf area index, poměr plochy listoví k ploše půdy porostu
- LEFR Laboratoř ekologické fyziologie rostlin
- MŠMT Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy
- NA numerická apertura
- NPQ nefotochemické zhášení při maximální fluorescenci
- P_N rychlost čisté fotosyntézy
- P_{Nmax} maximální rychlost čisté fotosyntézy
- ppm pars per milion, miliontina ($1 \cdot 10^{-6}$) (jednotka koncentrace)
- PřF UK Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
- R_D – rychlost temnostní (mitochondriální) respirace
- SV0 nefotochemické zhášení při minimální fluorescenci
- UDP-Glc uridindifosfát-glukosa
- ÚSBE Ústav systémové biologie a ekologie

Abstrakt

Cílem práce bylo zvolit a upravit metodiku pro počítání částic v prostoru, aby byla použitelná pro nevychýlený odhad počtu chloroplastů v mezofylových buňkách jehlic. Pro počítání chloroplastů byla poprvé použita metoda disektoru, která umožňuje nevychýlený odhad počtu chloroplastů na objem jehlice z preparátů čerstvých řezů jehlicemi nasnímaných konfokálním mikroskopem bez nutnosti složité přípravy preparátů.

Dalším cílem bylo porovnat vybrané fotosyntetické a anatomické charakteristiky ve slunných a stinných jehlicích smrku ztepilého pěstovaného dlouhodobě pod vlivem různé koncentrace CO_2 v atmosféře. Stromy byly pěstovány v kultivačních sférách na experimentálním ekologickém pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie Akademie věd České republiky, v.v.i. na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydách po dobu osmi let v současné atmosférické koncentraci CO_2 (v době experimentu stoupající od 357 až po 370 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$) a ve zvýšené koncentraci CO_2 (700 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$). Z korun stromů byly odebrány slunné jehlice ze třetího přeslenu (ozářenost 1000–1200 $\mu\text{mol}(\text{fotonů}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a stinné jehlice ze šestého přeslenu (ozářenost 300 $\mu\text{mol}(\text{fotonů}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Vlivem zvýšené koncentrace CO_2 nastaly rozdíly ve fotosyntetických parametrech, avšak pouze některé projevy na anatomické úrovni byly statisticky průkazně odlišné. Anatomické charakteristiky vykazovaly velkou variabilitu i v rámci téže varianty prostředí, avšak z časových důvodů nebylo možné rozšířit počet měřených vzorků. Působení zvýšené koncentrace CO_2 způsobilo zmírnění rozdílů ve stavbě slunných a stinných jehlic v EC. Průměrná délka slunných jehlic v AC byla průkazně vyšší než průměrná délka stinných jehlic v EC. Odhad objemu jehlice a objemu mezofylu byl průkazně větší u slunných jehlic v AC v porovnání se stinnými jehlicemi v téže koncentraci CO_2 a se stinnými jehlicemi v EC. Odhad objemového podílu mezofylu, odhad hustoty chloroplastů v jehlici, odhad hustoty mezofylových buněk v jehlici a ani odhad průměrného počtu chloroplastů na mezofylovou buňku se mezi porovnávanými variantami prostředí průkazně nelišil. Odhad celkového počtu chloroplastů v mezofylu jehlice byl průkazně větší u slunných jehlic v AC v porovnání se stinnými jehlicemi v AC i v EC.

Klíčová slova: anatomie jehlic, disektor, konfokální mikroskopie, nevychýlený odhad, ozářenost, počet chloroplastů, *Picea abies*, slunné a stinné jehlice, smrk ztepilý, systematicky rovnoměrně náhodný výběr, zvýšená koncentrace CO_2

Abstract

The aim of the present thesis was to choose and adjust a suitable methodology for counting particles in 3D space, which would be suitable for unbiased estimation of chloroplast number in needle mesophyll cells. The disector method was used for the first time to determine the number of chloroplasts. This method enables unbiased estimation of chloroplast number in needle volume from optical sections captured from fresh free-hand sections by confocal microscope. The sections did not need any pre-processing.

Another aim was to compare selected photosynthetic and anatomical characteristics of sun and shade Norway spruce needles, which were grown under different CO₂ concentration. The trees were grown for eight years in ambient (during the experiment increasing from 357 up to 370 μmol CO₂ · mol⁻¹) CO₂ concentration or elevated (700 μmol · mol⁻¹) CO₂ concentration in special glass domes on an experimental research site of the Institute of Systems Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic at Bílý Kříž in Moravskoslezské Beskydy mountains. The sun needles were taken from the 3rd whorl (irradiance 1000–1200 μmol(photons) · m⁻² · s⁻¹) of the crown and the shade needles were taken from the 6th whorl (irradiance 300 μmol(photons) · m⁻² · s⁻¹).

The elevated CO₂ concentration caused differences in the photosynthetic parameters, however only some of the anatomical parameters were significantly different from each other. The anatomical characteristics showed great variability even within the same variant of environment. However, it was not possible to extend the number of examined samples, because of limited time.

The effect of elevated CO₂ concentration mitigated the differences between sun and shade needle structure in EC. The average length of sun needles in AC was significantly longer than the average length of shade needles in EC. The needle volume and mesophyll volume estimations were significantly higher in sun AC needles than in shade needles in both CO₂ concentrations. The estimation of volume density of mesophyll, chloroplast density, mesophyll cell density and the average number of chloroplasts per cell didn't significantly differ among the variants of environment. The estimation of total number of chloroplasts per needle mesophyll was significantly higher in sun needles in AC in comparison with shade needles in AC and EC.

Keywords: needle anatomy, sun and shade needles, systematic uniform random sampling, unbiased estimation, disector, chloroplast number, irradiance, elevated CO₂, confocal microscopy *Picea abies*, Norway spruce

1. Úvod

V zemské atmosféře dochází v posledních desetiletích k nárůstu koncentrace oxidu uhličitého (CO_2), jenž je nepostradatelnou součástí koloběhu uhlíku v přírodě. Rostliny díky fotosyntéze získávají z CO_2 uhlík potřebný pro tvorbu svojí biomasy a zabudovávají ho do různých organických sloučenin. Změny koncentrace oxidu uhličitého způsobují změny v rychlosti fotosyntézy a v hodnotách dalších fotosyntetických a fyziologických parametrů. Následné ovlivnění dalších procesů probíhajících v rostlinách (např. dělení či expanze buněk, akumulace asimilátů) se může projevit i na úrovni anatomické stavby rostlinných orgánů, zejména listu.

Pro porozumění a objasnění vlivu zvýšené koncentrace CO_2 (dále též EC, „elevated concentration“) na rostliny je třeba zkoumat změny na všech hierarchických úrovních pozorování, tedy od úrovně ekosystému až po úroveň subcelulární, včetně úrovně anatomické stavby rostlin. Propojení poznatků získaných na jednotlivých úrovních potom poskytne ucelenou představu o reakci rostlin na EC. Temperátní a boreální jehličnaté lesy hrají významnou roli v globálním cyklu uhlíku, jelikož jsou důležitým zásobníkem uhlíku a dochází v nich k ukládání atmosférického uhlíku skrze proces fotosyntézy a současně k uvolňování uhlíku skrze procesy respirace a dekompozice opadu. To, zda je daný ekosystém sinkem nebo zdrojem uhlíku, záleží na vzájemném poměru těchto procesů. Objasnění mechanismů a důsledků působení EC na jehličnany umožní lépe předpokládat budoucí možné změny ve fyziologické funkci porostů jehličnanů a v úloze lesních porostů v celkovém koloběhu uhlíku v důsledku zvyšující se koncentrace CO_2 .

Předkládaná práce byla vypracována v rámci týmu doc. Albrechtové, který se zabývá ekofyziologickými studii dřevin, konkrétně zkoumáním vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na ekofyziologii smrku ztepilého – *Picea abies* L. Karst. Pro práci byl využit materiál odebraný členy týmu v rámci předchozí výzkumné činnosti týmu na experimentálním stanovišti ÚSBE AV ČR na Bílém Kříži v Beskydech a též byla převzata v době odběru naměřená data vypovídající o fotosyntetických parametrech odebíraných jehlic, použitých v této práci pro analýzu jejich anatomické stavby. Práce je součástí řešení projektu GA ČR č. P501/10/0340 s názvem „Vliv zvýšené koncentrace CO_2 a ozářenosti na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních“ a navazuje na ni další výzkum členů řešitelského kolektivu grantu z pracovišť Katedry experimentální biologie rostlin a Katedry genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze, Fyziologického ústavu AV ČR a Ústavu systémové biologie a ekologie (ÚSBE) AV ČR.

Hlavním cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit vliv zvýšené koncentrace CO₂ na vybrané anatomické parametry jehlic smrku ztepilého, zhodnotit případné odlišnosti v odezvě slunných a stinných jehlic na AC („ambient concentration“ – běžná atmosférická koncentrace CO₂) a EC (zvýšená atmosférická koncentrace CO₂) a porovnat výsledky na anatomické úrovni s naměřenými parametry fotosyntézy. Pro uskutečnění tohoto cíle bylo třeba vypracovat metodiku pro nevychýlený odhad počtu chloroplastů v mezofylové buňce s využitím metody disektoru, neboť dosavadní metody jsou často založeny na vychýleném odhadu, který je zatížen různými metodickými chybami. Tato metodická část se stala tedy prvním cílem předkládané práce. Pokud je mi známo, metoda disektoru byla v této práci poprvé použita k nevychýlenému odhadu početní hustoty chloroplastů v jehlici a počtu chloroplastů v mezofylové buňce.

V úvodu práce jsou popsány cíle práce a testované hypotézy. Práce má dále klasické členění – následují kapitoly s literárním přehledem, materiál a metody, výsledky, diskuse a shrnutí. V literárním přehledu jsou shrnuty dosavadní poznatky o vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého a ozáření na anatomickou stavbu jehlic jehličnanů. Dále jsou zmíněna možná úskalí doposud používaných metod měření počtu chloroplastů v buňkách a listech rostlin a následuje přehled těchto metod. V další kapitole je popsán použitý materiál a metodika, v následujícím oddíle je čtenář seznámen s výsledky práce, které jsou posléze diskutovány v kapitole diskuse. Závěr práce tvoří shrnutí.

1.1 Cíle práce a hypotézy

Cíle práce:

- Vypracovat metodiku pro zjištění nevychýleného odhadu hustoty chloroplastů v mezofylu jehlic.
 - Aplikovat systematicky rovnoměrně náhodný výběr vzorkovacích polí na příčném řezu jehlicí.
 - Otestovat možnosti a podmínky použití metody disektoru pro počítání chloroplastů.
- Porovnat působení vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na vybrané anatomické parametry stinných a slunných jehlic smrku ztepilého:
 - Vybrané anatomické parametry:
 - délka a objem jehlice

- objemový podíl mezofylu
- hustota buněk v mezofylu
- hustota chloroplastů v mezofylu
- průměrný počet chloroplastů na mezofylovou buňku

Hypotéza č. 1: Vybrané anatomické parametry se budou lišit mezi slunnými a stinnými jehlicemi při AC. U slunných jehlic oproti stinným bude větší objemový podíl mezofylu vzhledem k celkovému objemu jehlice, větší počet chloroplastů na buňku, větší hustota chloroplastů i buněk.

Hypotéza č. 2: Vybrané anatomické parametry se budou lišit mezi slunnými a stinnými jehlicemi při EC. U slunných jehlic oproti stinným bude větší objemový podíl mezofylu, větší počet chloroplastů na buňku, větší hustota chloroplastů i buněk.

Hypotéza č. 3: Vybrané anatomické parametry se budou lišit mezi slunnými jehlicemi v AC a v EC. U jehlic ve zvýšené koncentraci CO₂ oproti těm v AC bude výraznější strukturální adaptace slunného listu, tj. větší objemový podíl mezofylu, větší počet chloroplastů na buňku, větší hustota chloroplastů i buněk.

Hypotéza č. 4: Vybrané anatomické parametry se budou lišit mezi stinnými jehlicemi v AC a v EC. U jehlic v EC oproti těm v AC bude větší objemový podíl mezofylu, větší počet chloroplastů na buňku, větší hustota chloroplastů i buněk.

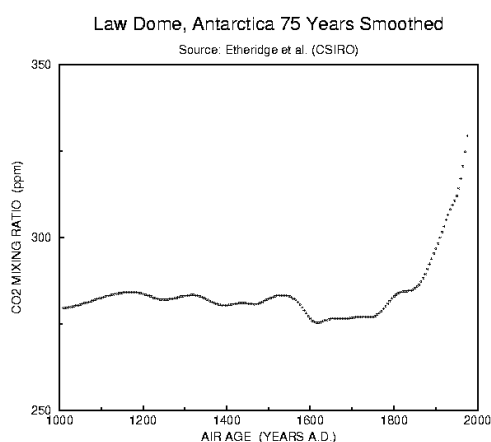
- Zjistit, zda počet chloroplastů závisí na rychlosti světlem saturevané asimilace CO₂, zdánlivé kvantové účinnosti a rychlosti temnostní (mitochondriální) respirace naměřené v ÚSBE AV ČR.

Hypotéza č. 5: U jehlic s vyšší rychlostí světlem saturevané asimilace CO₂ bude zjištěn větší průměrný počet chloroplastů v buňce a celkový počet chloroplastů v mezofylu jehlice.

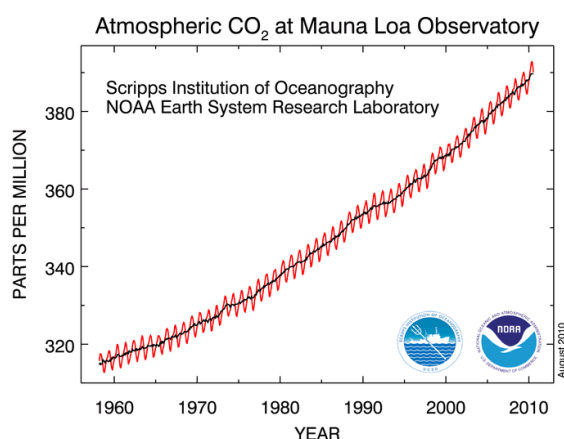
2. Literární přehled

2.1 Změny v koncentraci CO₂ v atmosféře Země a úloha rostlin v globálním koloběhu uhlíku

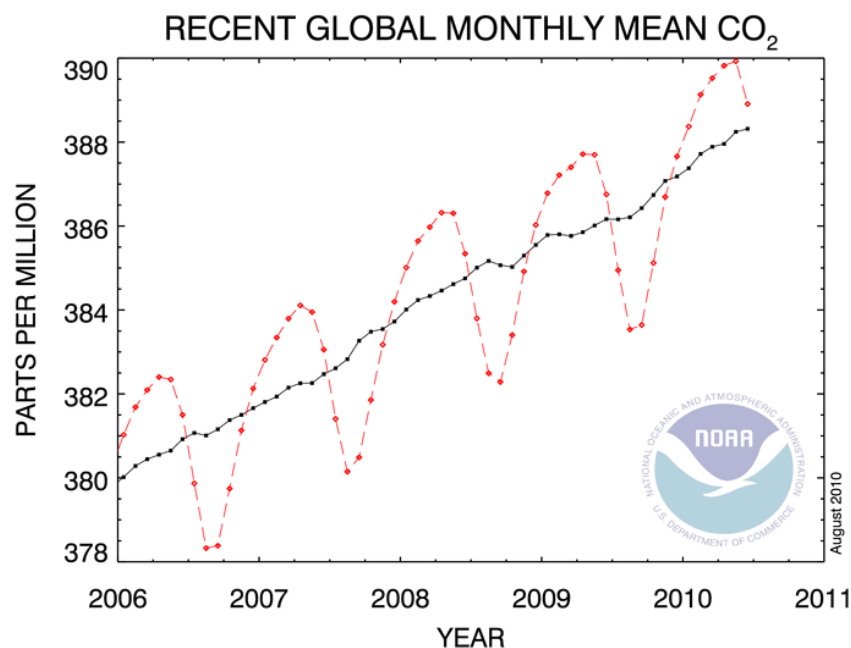
V posledních desetiletích dochází ke stálému zvyšování koncentrace CO₂ v atmosféře (obr. 2.1, 2.2 a 2.3, Etheridge *et al.*, 1998; Tans, 2010), a proto je třeba se zabývat možnými vlivy tohoto jevu na mnohé procesy v přírodě. Vegetace – především lesy – se významně podílí na globálním koloběhu uhlíku (rev. Calfapietra *et al.*, 2010), a proto je důležité zjistit, jaká bude úloha lesních ekosystémů v tomto procesu při nadálém zvyšování koncentrace CO₂.



Obr. 2.1: Koncentrace CO₂ v atmosféře v letech 1006 až 1978 zjištěná ze vzduchových bublin uchovaných v ledovci Law Dome na Antarktidě. Graf byl převzat z práce Etheridge *et al.* (1998) z webové stránky <<http://cdiac.ornl.gov/trends/co2/graphics/lawdome.smooth75.gif>>.



Obr. 2.2: Průměrná měsíční koncentrace CO₂ v zemské atmosféře měřená na sopce Mauna Loa na Havaji od března roku 1958 do srpna roku 2010. Červená křivka ukazuje průměrné měsíční hodnoty. Kolísání hodnot je dáno tím, že koncentrace CO₂ celosvětově stoupá v období zimních měsíců na severní polokouli, protože v té době klesá jeho spotřeba fotosyntézou vegetace severní polokoule. Černá křivka ukazuje průměrné měsíční hodnoty po korekci pro průměrný sezónní cyklus; je určena jako klouzavý průměr sedmi přilehlých sezónních cyklů, který je korigován s výjimkou prvních a posledních tří a půl let záznamu, kdy je sezónní cyklus zprůměrován z prvních, respektive posledních sedmi let. Data pro poslední rok jsou předběžná, budou ještě korigována. Uváděná data jsou hodnotami naměřenými v nadmořské výšce 3400 m v subtropické oblasti severní polokoule a nemusejí se shodovat s celosvětovou průměrnou koncentrací CO₂ na povrchu. Převzato z Tans (2010) z webové stránky <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>>.



Obr. 2.3: Průměrná celosvětová měsíční koncentrace CO_2 v zemské atmosféře od ledna roku 2006 do srpna roku 2010 měřená nad hladinou moře. Červená čárkovaná křivka ukazuje průměrné měsíční hodnoty. Kolísání hodnot je dáno tím, že koncentrace CO_2 celosvětově stoupá v období zimních měsíců na severní polokouli, protože v té době klesá jeho spotřeba fotosyntézou vegetace severní polokoule. Černá křivka ukazuje průměrné měsíční hodnoty po korekci pro průměrný sezónní cyklus; je určena jako klouzavý průměr sedmi přilehlých sezónních cyklů, který je korigován s výjimkou prvních a posledních tří a půl let záznamu, kdy je sezónní cyklus zprůměrován z prvních, respektive posledních sedmi let. Data pro poslední rok jsou předběžná, budou ještě korigována. Převzato z Tans (2010), z webové stránky <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/webdata/ccgg/trends/co2_trend_gl.png>.

Rostliny se účastní koloběhu uhlíku, protože se při fotosyntéze uhlík z CO_2 zabudovává do jejich biomasy v podobě organických sloučenin a díky respiraci a rozkladným procesům se uvolňuje do atmosféry a pedosféry. V koloběhu uhlíku dochází k výměně uhlíku ve formě různých sloučenin mezi jeho zdroji a sinky, které se nacházejí v atmosféře, litosféře, hydrosféře, pedosféře i biosféře. Zdrojem uhlíku, který se uvolňuje do atmosféry, je mimo procesy dýchání a dekompozice zejména spalování fosilních paliv a odlesňování. Atmosférický uhlík je ve formě CO_2 pohlcován oceány i vegetací na souši a je v různých formách ukládán do biomasy organismů, do půdy i do sedimentů. Vzhledem k dlouhověkosti stromů by lesy – za předpokladu, že by v dlouhodobém měřítku množství uhlíku akumulované v rostlinné biomase díky procesu fotosyntézy převyšovalo množství uhlíku uvolněné respirací a rozkladnými procesy – mohly sloužit jako dlouhodobé sinky uhlíku. Pro objasnění dopadů zvyšování koncentrace CO_2 (dále $[\text{CO}_2]$) na lesní ekosystémy a jejich budoucí funkci v koloběhu uhlíku je třeba posoudit změny na všech hierarchických úrovních pozorování a propojit je v ucelený obraz. S ohledem na úzké propojení fyziologických procesů a anatomické stavby rostlin je třeba se zabývat i vlivy zvýšené $[\text{CO}_2]$ na strukturu rostlinných orgánů. Listy, jakožto orgány, v nichž mimo jiné dochází k fotosyntéze a

respiraci, patří k nejvíce ovlivněným částem rostlin. Jejich anatomická stavba závisí na podmínkách prostředí a ovlivňuje fotosyntetické procesy, a proto je opodstatněné kromě fotosyntetických parametrů zkoumat i s nimi související anatomické parametry.

Smrk ztepilý *Picea abies* L. Karst. patří mezi hojně se vyskytující druhy lesních dřevin v temperátních oblastech Evropy. Díky svým vlastnostem má v Evropě velký hospodářský význam, a proto byl pro hospodářské účely vysazován i mimo svá původní stanoviště. V České republice zabírá porost smrku ztepilého více než polovinu z celkové plochy porostní půdy (ÚHÚL, 2008).

2.2 Metody studia vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny

Pro výzkum vlivu zvýšené koncentrace CO₂ v atmosféře se používají různé experimentální systémy. Pro zjišťování vlivu EC na fyziologické parametry rostlin se používají květy nebo vaky připevňované na jednotlivé větve nebo části větví; tato metoda má však tu nevýhodu, že zvýšenou [CO₂] není ovlivněna celá rostlina, ale pouze její část (rev. Nátr, 2000). Nejdříve se používaly uzavřené růstové komory, které se však ukázaly jako nevhodné, protože v nich nastával tzv. komorový efekt, který zahrnuje např. sníženou ozáření a vyšší teplotu (kap. 3.1.2). Později byly vyvinuty otevřené růstové komory (OTC, Open Top Chamber), v nichž již nebyl problém s nižší ozáření, ale nevýhody v podobě snížené rychlosti větru a odlišné teploty a relativní vlhkosti vzduchu zůstávaly (Ceulemans and Mousseau, 1994). Další nevýhodou používaných komor může být ovlivnění rostlin tím, že jsou pěstovány v květináčích, což může vést k odlišným reakcím na EC než při pěstování rostlin volně v půdě (rev. (Ceulemans and Mousseau, 1994).

Dalším z experimentálních systémů pro pěstování rostlin v EC jsou skleněné lamelové kultivační sféry určené ke zkoumání vlivu EC na smrk ztepilý, které byly v roce 1997 vybudovány na experimentálním ekologickém stanovišti ÚSBE AVČR, v.v.i. na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech (Urban *et al.*, 2001). Tyto sféry byly vybudovány okolo stromů vysazených do volné půdy a mají automaticky regulovatelná okna, což umožňuje výměnu vzduchu a působení okolního větru na rostliny (Urban *et al.*, 2001).

V současné době se pro výzkum vlivu EC na rostliny hojně používá systém FACE, tj. Free Air CO₂ Enrichment (rev. Nátr, 2000). Systém, který byl vyvinut na konci 80. let 20. století, je složen z kruhovitě uspořádaných trysek, ze kterých na volnou pokusnou plochu proudí vzduch obohacený o CO₂ (Lewin *et al.*, 1994). Přívod CO₂ je regulován, aby byla zajištěna jeho určitá koncentrace. Stanoviště s těmito systémy se nacházejí na desítkách míst

po celém světě (rev. (Nowak *et al.*, 2004). Tato metoda je velmi finančně náročná vzhledem k množství spotřebovaného CO₂. Proto se v současné době uvažuje o tom, jak ji v budoucnosti vylepšit – nabízí se například možnost použít CO₂, který je vedlejším produktem chemické výroby (Calfapietra *et al.*, 2010).

Kromě uměle vybudovaných systémů s obohacováním vzduchu o CO₂ lze rostliny pod vlivem EC zkoumat v okolí přirozených výronů CO₂, což však v sobě může skrývat různé nevýhody – např. kolísání vypouštěného CO₂ v čase a obtížné určení kontrolního stanoviště (rev. Nátr, 2000).

Pro studium působení EC na rostliny lze také využít paleobotanických nálezů – např. hustotu průduchů je možné zjistit na fragmentech pokožky fosilních listů (Beerling and Chaloner, 1993). Také je možné využít metod dendrochronologie (rev. Ceulemans and Mousseau, 1994; rev. Nátr, 2000)

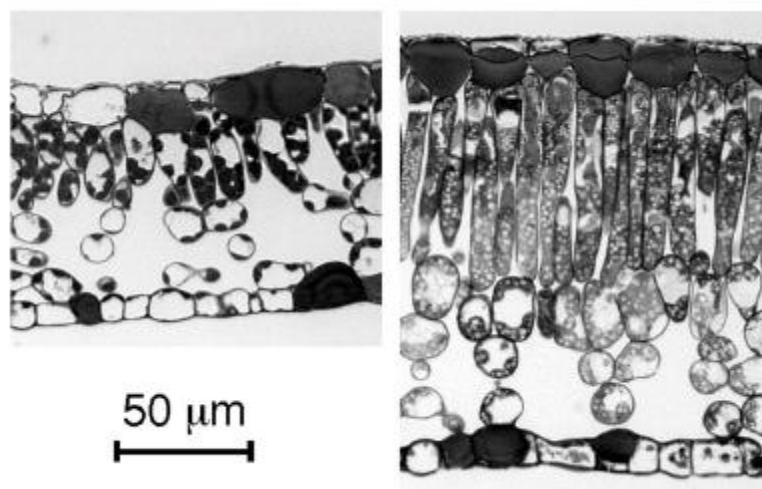
2.3 Vliv faktorů prostředí na anatomické a fyziologické vlastnosti listů a jehlic

Anatomická stavba rostliny je ovlivněna genotypem rostliny a vnějšími podmínkami, ve kterých rostlina žije. Nejenom podmínky prostředí, dostupnost vody a živin a interakce s ostatními organismy ovlivňují stavbu rostliny – jedněmi z nejdůležitějších parametrů prostředí, které utvářejí strukturu listu, jsou ozáření a koncentrace CO₂, výrazně ovlivňující proces fotosyntézy.

2.3.1 Vliv ozáření na listy a jehlice

Ozáření se liší napříč porostem a odpověď na změny ve světelných poměrech se liší mezidruhově i v rámci druhu vlivem stáří listů i dalších podmínek (rev. Niinemets, 2007). Při zvýšené ozáření zpravidla dochází u dorziventrálních k nárůstu tloušťky mezofylu, ve kterém se vytváří více vrstev palisádového parenchymu, jak ilustruje obr. 2.4 (Hanba *et al.*, 2002; Niinemets, 2007) listy, takto adaptované na zvýšenou ozáření, se označují jako slunné listy. Slunné listy jsou tlustší, protože v tlustších listech je díky zvětšení povrchu mezofylových buněk a zvětšení počtu nebo velikosti chloroplastů větší povrch chloroplastů vystaven stěnám mezofylových buněk sousedícím s mezibuněčnými prostory. Tím je poskytnut větší povrch pro vstřebávání CO₂ do chloroplastů, čímž je zajištěna snadnější difuze CO₂ do chloroplastů a CO₂ je tak lépe dostupný pro enzym Rubisco (Terashima *et al.*, 2006). Díky tomu dochází k nárůstu A_{max} (světlem saturované rychlosti asimilace CO₂) a P_{max}

(světlem saturované rychlosti fotosyntézy, fotosyntetické kapacity) (Hanba *et al.*, 2002; Terashima *et al.*, 2006; Oguchi *et al.*, 2008). Slunné listy také dosahují větší účinnosti využití vody (Hanba *et al.*, 2002). Byla prokázána výhodnost investice rostliny do přeměny původně stinných listů na tlustší slunné listy po vystavení těchto listů vyšší ozáření: Vložené prostředky nutné pro tvorbu nové biomasy byly zhodnoceny větší rychlostí fotosyntézy a vyšším denním výtěžkem uhlíku slunných listů (Oguchi *et al.*, 2008).



Obr. 2.4: Stinný list javoru *Acer mono* Maxim. při 7% slunečním světle (vlevo) a slunný list téhož druhu při plném osvětlení slunečním zářením (vpravo). Slunný list vykazuje téměř dvojnásobnou tloušťku a kompaktnější a tlustší vrstvu palisádového parenchymu. Převzato z (Hanba *et al.*) (2002).

Také u listů jehličnanů – jehlic – může docházet vlivem zvýšené ozáření k strukturálním změnám. Tyto změny jsou však značně druhově specifické a rozdíly mezi stinnými a slunnými jehlicemi nemusejí být vždy patrné; přesto lze vyvodit, že jehlice mívají při zvýšené ozáření větší poměr objemu k celkovému povrchu a vrstva mezofylu bývá tlustší (rev. Niinemets, 2007).

U jedle bělokoré *Abies alba* Mill. a smrku ztepilého *Picea abies* L. Karst. závisel tvar průřezů jehlicemi na dostupnosti světla – stinné jehlice byly na řezu zploštělé na rozdíl od skoro kruhovitých slunných jehlic, které měly větší poměr poloviny celkového povrchu jehlice k projekční ploše (Cescatti and Zorer, 2003; rev. Niinemets, 2007).

Naproti tomu Youngblood a Ferguson (2003), kteří zkoumali ovlivnění stavby jehlic semenáčků podrostu vlivem různé ozáření u jedle obrovské *Abies grandis* (Douglas) Lindl., jedle plstnatoplodé *Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt. a u smrku Engelmannova *Picea engelmannii* Engelm., neprokázali žádné průkazné rozdíly v délce a šířce jehlic a v počtu vrstev mezofylu a velikosti mezofylových buněk mezi jehlicemi ze zastíněného podrostu, z

podrostu po částečném odstranění stromů nadrostu a z podrostu s otevřeným zápojem. Všechny tyto parametry byly v rámci téhož druhu nezávislé na světelném prostředí. Autoři to přisuzují ekologické adaptaci těchto tří druhů, díky které se sice nedokážou rychle přizpůsobit aktuálnímu světelnému prostředí, ale mohou dlouhodobě přetrvávat v podrostu s nižší ozářeností, které jsou přizpůsobeny. Z těchto výsledků vyplývá, že tvorba struktury jehlice nezávisí pouze na vnějším prostředí, ale může být silně determinována geneticky.

Kromě změn ve vnitřní stavbě jehlic byly pod vlivem různé ozářenosti zaznamenány i změny ve vzájemném uspořádání jehlic na výhonu: U stinných výhonů jedle bělokoré *Abies alba* Miller převládal horizontální růst jehlic – více jehlic rostlo do stran a méně směrem kolmo ke světlu – byla tedy patrná snaha zachytit co nejvíce světla v horších světelných podmínkách. U slunných výhonů téhož druhu rostly jehlice z výhonu kolem dokola rovnoměrně (Cescatti and Zorer, 2003).

2.3.2 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny

Oxid uhličitý je substrátem pro fotosyntézu, a proto tvoří pro rostliny nezbytnou složku atmosféry. Zvýšená koncentrace CO₂ v atmosféře však v rostlinách způsobuje celou řadu změn, jejichž důsledky ani pozadí nejsou vždy zcela objasněné, protože tyto změny jsou výsledkem složitých vzájemných interakcí mnoha procesů. Změny nastávají ve fyziologických i ve strukturálních parametrech rostlin na všech úrovních pozorování – od buněčné ultrastruktury až po úroveň funkce celého ekosystému.

Vlivů EC na rostliny již bylo popsáno mnoho a věnuje se jim velké množství studií. V české literatuře je působení EC na rostliny přehledně a srozumitelně shrnuto např. v publikaci Nátr (2000). V anglicky psaných odborných časopisech lze najít množství souhrnných článků na toto téma (Pritchard *et al.*, 1999; Ainsworth and Long, 2005; Korner, 2006; Leakey *et al.*, 2009).

2.3.2.1 Hlavní vlivy zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny

Vlivy zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny lze rozlišit na přímé a nepřímé (rev. Nátr, 2000). Mezi přímé vlivy EC náleží působení na změny v rychlosti fotosyntézy, fotorespirace a dýchání a změny ve vodivosti průduchů. Nepřímé vlivy vznikají jako následky vlivů přímých. V této podkapitole se budu věnovat shrnutí obecných vlivů EC na fyziologické procesy v rostlinách, o působení EC na anatomii listu pojednává následující podkapitola.

Vlivem zvýšené $[\text{CO}_2]$ se zvyšuje světlem saturovaná rychlost asimilace uhlíku a snižuje fotorespirace, a proto dochází ke zvýšení rychlosti fotosyntézy (Griffin *et al.*, 2001; Sholtis *et al.*, 2004; rev. Leakey *et al.*, 2009). U C_4 rostlin je maximální rychlosti čisté fotosyntézy ovlivněné koncentrací CO_2 již téměř dosaženo při současné koncentraci CO_2 , avšak u C_3 rostlin může rychlost fotosyntézy díky zvyšující se $[\text{CO}_2]$ ještě stoupat, protože se saturuje až při 1000 ppm (rev. Nátr, 2000; rev.; rev. Körner, 2006; rev. Leakey *et al.*, 2009).

Při EC však může dojít také k opačnému jevu, a to k fotosyntetické aklimaci neboli aklimační depresi (zpomalení denní asimilace uhlíku), která může být způsobena velkou akumulací škrobových zrn v chloroplastech, kvůli nimž se může narušit struktura thylakoidních membrán (Pritchard *et al.*, 1997; Teng *et al.*, 2006). Pokles rychlosti fotosyntézy bývá také spojován s poklesem obsahu N v listu, který se dává do souvislosti s poklesem obsahu enzymu Rubisco (rev. Ainsworth and Long, 2005).

Díky zvýšenému ukládání asimilátů dochází k změnám ve složení sušiny biomasy – stoupá relativní obsah uhlíku k dusíku a biomasa obsahuje relativně více sacharidů než bílkovin (rev. Nátr, 2000; rev. Leakey *et al.*, 2009). Nárůst akumulace nestrukturních sacharidů v listech byl zaznamenán u mnoha druhů rostlin od bylin až po jehličnany (např. Oksanen *et al.*, 2001; Eguchi *et al.*, 2004; Sholtis *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2006; Onoda *et al.*, 2007). Změny v poměru C : N jsou hlavním důvodem vyšší účinnosti využití dusíku – tj. množství fixovaného CO_2 vztažené na obsah N v listech – při EC (rev. Nátr, 2000; rev. Leakey *et al.*, 2009). Změny ve složení biomasy ovlivňují její výživovou hodnotu pro herbivory. EC tím nepřímo působí i na druhové složení zejména herbivorního hmyzu, který vnímá odlišné složení potravy. Změny v druhovém složení rostlinného společenstva pak mohou ovlivnit i organismy na dalších stupních potravního řetězce (rev. Nátr, 2000).

Dýchání, při němž se vytváří ATP a redukční ekvivalenty při rozkládání produktů fotosyntézy za spotřeby O_2 a uvolňování CO_2 , je rovněž ovlivněno $[\text{CO}_2]$. Při krátkodobém vystavení EC rychlost dýchání klesá, avšak v případě dlouhodobých pozorování jsou pro různé druhy uváděny rozporuplné údaje – byla zaznamenána stimulace i inhibice dýchání v EC (rev. Nátr, 2000, rev. (Leakey *et al.*, 2009).

V EC dochází k přivírání průduchů, a tudíž k snížení jejich vodivosti. Díky tomu dochází k zvýšení účinnosti využití vody (poměru rychlosti fotosyntézy k rychlosti transpirace) a k snížení evapotranspirace porostu (rev. Nátr, 2000; rev. Leakey *et al.*, 2009). V půdě posléze zůstane více vody, což usnadní příjem živin z půdy (Körner, 2003). Kromě nárůstu účinnosti využití vody se mohou některé druhy rostlin lépe vyrovnávat s vodním stresem, protože zvýšená tvorba produktů fotosyntézy může zvýšit osmotické přizpůsobení a

snížená vodivost průduchů a rychlost transpirace v EC umožní rostlinám udržet větší vodní potenciál během období sucha; tyto lépe adaptované druhy rostlin proto pravděpodobně budou moci v budoucím prostředí se zvýšenou [CO₂] rozšířit svá stanoviště i na místa pro ně dosud nepříznivá (rev. Pospisilova and Catsky, 1999).

Se zvyšující se koncentrací CO₂ klesá hustota průduchů (počet průduchů na jednotku plochy listu), což dokládají i fosilní nálezy listů vrby bylinné *Salix herbacea* L. (Beerling a Chaloner, 1993). Pokusy na bylinách, zkoumající vliv EC na počty průduchů, přinášejí rozdílné výsledky, pravděpodobně způsobené mezidruhovými rozdíly. U fazolu obecného *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tender Green pěstovaného v EC nebyla zjištěna změna ani v hustotě průduchů, ani ve stomatálním indexu listů (poměrném zastoupení stomatálních buněk v celkovém součtu stomatálních a epidermálních buněk) (Ranasinghe and Taylor, 1996). U sóji luštinaté *Glycine max* L. Merrill se v EC stomatální index zvýšil stejně jako frekvence průduchů (počet průduchů na délku listu), s výjimkou pokusné koncentrace CO₂ 718 ppm, kde došlo k poklesu obou parametrů (Thomas and Harvey, 1983). U *Arabidopsis thaliana* L. bylo snížení hustoty průduchů a stomatálního indexu důvodem poklesu vodivosti průduchů a rychlosti transpirace (Teng *et al.*, 2006). Snížení vodivosti průduchů vlivem EC bylo zjištěno i u dalších bylin (Bettarini *et al.*, 1998; Onoda *et al.*, 2007).

U jehličnanů závisí počet průduchů na okolních podmínkách v době tvorby jehlice, protože zvětšování mladých jehlic se děje pomocí zvětšování velikosti buněk a méně buněčným dělením (Kouwenberg *et al.*, 2004). V průběhu vývoje jehlic tak již není možné počty průduchů ovlivnit. Tento jev byl pozorován na jehlicích *Pinus sylvestris* L. ve studii Lin *et al.* (2001), kdy v EC poklesla hustota průduchů pravděpodobně právě následkem nárůstu expanze epidermálních buněk, přičemž se počet řad průduchů nezměnil. V dalších studiích na jehličnanech nebylo ovlivnění počtu průduchů v EC pozorováno. Jehlice semenáčků *Pinus palustris* P. Mill., které byly od raných vývojových stádií pupenů v EC, měly stejný počet řad průduchů a stejnou hustotu průduchů na jehlicích jako jejich protějšky v AC (Pritchard *et al.*, 1998). Také tohoroční jehlice semenáčků *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco po 3 letech experimentu v EC nevykazovaly změny v hustotě, vodivosti ani rychlosti transpirace průduchů (Apple *et al.*, 2000); stejně tak frekvence průduchů u *Picea abies* L. Karst. (Fendrych, 2005) a hustota průduchů *Pinus sylvestris* L. (Luomala *et al.*, 2005) nebyly zvýšenou koncentrací CO₂ ovlivněny.

Zvýšená [CO₂] může také způsobovat změny v rychlosti růstu a vývoje rostlin, jak bylo dokumentováno v četných studiích na různých dřevinách. Např. u *Pinus sylvestris* L. bylo zaznamenáno urychlení vývoje pupenů a předčasný opad jehlic (Jach and Ceulemans,

1999) a naopak u *Populus nigra* L., *Populus alba* L. a *Populus x euramericana* (Dode) Guinier ex Piccarolo nastalo oddálení podzimní senescence listů (Tricker *et al.*, 2004).

Při EC bylo na rostlinách více jehlic či listů (Conroy *et al.*, 1986; Ferris *et al.*, 2001), příčinou čehož mohl být větší počet rychleji se dělicích meristemických buněk, který vedl ke zkrácení plastochronu (Kinsman *et al.*, 1997). Může docházet i k nárůstu počtu větví (rev. Pritchard *et al.*, 1999; rev. Ainsworth and Long, 2005) a výhonů (Tissue *et al.*, 1996). Pritchard (1999) ve svém souhrnném článku zmiňuje sníženou apikální dominanci jako možný důvod nárůstu počtu větví a jejich velikosti při pěstování rostlin v EC. V literatuře zaznamenal odlišné způsoby větvení, které přisuzuje rozdílům ve vývojových procesech v apexu prýtu. Změny ve větvení nadzemních i podzemních částí rostlin mohou ovlivnit kompetici mezi rostlinnými druhy v EC (rev. Pritchard *et al.*, 1999).

Obecně se také vlivem experimentálních podmínek a u různých druhů lišila rychlost růstu a produkce nadzemní biomasy rostlin (rev. Ainsworth and Long, 2005). Relativní rychlost růstu (tedy rychlost přírůstku biomasy) bývá při EC zvýšená, a to zejména v počátečních fázích experimentu (Tissue *et al.*, 1996, Jach and Ceulemans, 1999) a při růstu listů (Ferris *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003). Při zvýšené [CO₂] dorostly některé rostliny do větších výšek a zejména stromy měly větší průměr stonku (kmene) (rev. Ainsworth a Long, 2005). Růst v EC také vedl k nárůstu délky kořenů (rev. Pritchard *et al.*, 1999). Při EC také může docházet k nárůstu hmotnosti některých druhů rostlin, což bylo nejčastěji pozorováno u stromů a keřů a méně často u C₃ plodin (rev. Ainsworth a Long, 2005). Porozumění tomu, jak vzrůstající asimilace uhlíku ovlivňuje růstové procesy umožní lépe předpovídat, jak se rostliny změní při nárůstu [CO₂] (rev. Pritchard *et al.*, 1999).

Gibeaut *et al.* (2001) dávají do souvislosti zvýšení rychlosti přírůstku biomasy *Arabidopsis thaliana* L. v EC s aktivitou enzymu UDP-Glc dehydrogenázy, která byla v EC zvýšená a umožnila rychlejší syntézu xyloglukanů a dalších polysacharidů z matrixu buněčné stěny. Rychlejší růst buněčných stěn a s ním spojené zvětšování objemu buněk může mít za následek větší rychlost růstu listů. Kromě zvětšování objemu buněk byla při EC zaznamenána i kratší doba trvání buněčného cyklu (Kinsman *et al.*, 1997). Kvůli zvýšené [CO₂] dochází k zvýšení rychlosti fotosyntézy a posléze k větší u tvorbě asimilátů včetně sacharózy, jež je signální molekulou (Kinsman *et al.*, 1997). Jak uvádějí Smith a Stitt (2007), určitá hladina sacharózy je podmínkou pro přechod buňky z G1 do S fáze, protože sacharóza zvyšuje expresi genu pro cyklin D (CYCD3;1). Zvýšená koncentrace CO₂ by tedy mohla mít za následek urychlení trvání buněčného cyklu.

Index listové pokrývnosti (LAI, leaf area index; poměr plochy listoví k ploše půdy) nebyl při růstu rostlin v EC ovlivněn jednoznačným směrem, odpověď se mezi druhy lišila (rev. Ainsworth and Long, 2005). Podobně tomu bylo i s celkovou listovou plochou rostliny, kde část studií vykazovala její nárůst, ale některé studie zaznamenaly i její pokles nebo nezaznamenaly změny (rev. Pritchard *et al.*, 1999).

Při zkoumání vlivů EC na rostliny velmi záleží na plánu celého pokusu, zejména na způsobu obohacování vzduchu o CO₂. Teoretické modely a pokusy v uzavřených komorách, kde však působí komorový efekt (kap. 3.1.2), často předpokládaly zvýšený výnos plodin v EC. Tento předpoklad však nebyl do plné míry prokázán při polních pokusech se systémem FACE (free air CO₂ enrichment), kde na volnou neuzavřenou pokusnou plochu z kruhovitě uspořádaných trysek proudí vzduch obohacený o CO₂ (rev. Ainsworth and Long, 2005), rev. (Leakey *et al.*, 2009), a tudíž zde komorový efekt nepůsobí.

Při delším trvání experimentu může dojít k odeznění původně pozorovaných změn – například relativní rychlost růstu semenáčků borovice kadidlové *Pinus taeda* L. byla v prvních 11 měsících experimentu v EC vyšší než v AC, avšak posléze byly obě hodnoty srovnatelné (Tissue *et al.*, 1996); stejný jev byl zaznamenán u semenáčků borovice lesní *Pinus sylvestris* L., u nichž byl větší nárůst výšky hlavního výhonu ve zvýšené [CO₂] zaznamenán pouze v prvním roce pěstování a nikoli ve druhém (Jach and Ceulemans, 1999).

Zvýšená koncentrace CO₂ interaguje s dalšími podmínkami prostředí, a proto její působení na rostliny závisí i na dalších vlastnostech prostředí, například na teplotě nebo dostupnosti živin či vody (rev. Nátr, 2000). Velmi důležitým faktorem je složení půdy, v níž jsou pokusné rostliny pěstovány a růstové podmínky, tj. dostupnost živin, poskytnutý prostor pro růst nad i pod zemí a další (rev. Korner, 2006).

Citlivost (míra odpovědi) rostlin na EC nepochybně záleží též na jejich genotypu (druhu) – rostliny různých, ač příbuzných druhů mnohdy reagují na stejné podmínky odlišně. Mezidruhově rozdílné důsledky ovlivnění zvýšenou koncentrací CO₂ byly zjištěny při různé dostupnosti dusíku (rev. Ainsworth and Long, 2005). Například při pěstování bříz při EC v půdě s velkým obsahem živin došlo v důsledku aklimace k snížení rychlosti fotosyntézy u břízy mandžuské *Betula platyphylla* Sukatschev, zatímco u břízy *Betula Maximowicziana* Regel nebylo snížení zaznamenáno (Eguchi *et al.*, 2008). Obecně se také vlivem experimentálních podmínek a u různých druhů lišila rychlost růstu a produkce nadzemní biomasy rostlin (rev. Ainsworth and Long, 2005). Taktéž změna rychlosti růstu buněk listů tří druhů topolů byla u každého z druhů rozdílná (Ferris *et al.*, 2001).

2.3.2.2 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na anatomii listů a jehlic

K faktorům prostředí, které mohou silně ovlivňovat anatomii jehlic, patří také koncentrace CO₂. Velikost listů a jejich anatomie jsou při růstu rostlin v EC často změněny, ale rozsah těchto změn, které se mnohdy zmírňují při dospívání listů, závisí také na dalších faktorech, jako je genetická plasticita rostlin, dostupnost živin, teplota a fenologie (rev. Pritchard *et al.*, 1999).

Ve zvýšené koncentraci CO₂ může dojít k změnám tvaru a zvětšování plochy (Ferris *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003; Thomas and Bazzaz, 1996) a tloušťky (Thomas and Harvey, 1983; Leadley *et al.*, 1987; Teng *et al.*, 2006) dorziventrálních listů, přičemž změny tvaru bývají pravděpodobně vyvolány rozdílnou rychlostí zvětšování buněk v různých částech listu a zvětšování plochy listů souvisí s vyšší produkcí biomasy v EC, s rychlejším dělením a zvětšováním buněk, které vede k expanzi listů (Ferris *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003). Nárůst tloušťky mezofylu *Glycine max* L. v EC byl způsoben nárůstem palisádového parenchymu o jednu vrstvu buněk a též tlustší vrstvou houbovitého parenchymu (Thomas and Harvey, 1983). Změny v tloušťce dorziventrálních listů nejsou vždy pozorovány, při některých experimentech se tloušťka listů při EC nijak nezměnila (Thomas and Harvey, 1983; Taylor *et al.*, 2003).

Změny ve velikosti listů vlivem EC nastaly u listů několika druhů topolu *Populus x euramericana* (Dode) Guinier ex Piccarolo, *Populus nigra* L. a *Populus alba* L. následkem rychlejšího dělení a zvětšování buněk, které vedlo k expanzi listů (Ferris *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003). Jak již bylo zmíněno v předchozí podkapitole, při EC pozorovaná zvýšená aktivita enzymu UDP-Glc dehydrogenázy umožňuje rychlejší syntézu polysacharidů z matrixu buněčné stěny, díky čemuž může docházet k zvětšování buněčných stěn a objemu buněk (Gibeaut *et al.*, 2001). Při EC byla také zaznamenána kratší doba trvání buněčného cyklu, a to u buněk v apikálním dómu stonkového meristému srhy říznačky *Dactylis glomerata* L., kde následkem toho poklesl plastochron (Kinsman *et al.*, 1997).

U jehlic bývá pod vlivem EC často zjištěna větší tloušťka mezofylu nebo jeho větší poměrné zastoupení na řezu jehlicí, jako tomu bylo u *Pinus taeda* L. při [CO₂] = 910 ppm (Thomas and Harvey, 1983) a u *Pinus sylvestris* L., kde byl zároveň zaznamenán i větší počet a velikost mezofylových buněk (Lin *et al.*, 2001). V jehlicích *Pinus palustris* P. Mill. po 12 měsících v EC byl též zaznamenán trend k větší ploše mezofylu na příčném řezu, avšak po 20 měsících v EC již takový trend nebyl pozorován (Pritchard *et al.*, 1998). Některé studie však přicházejí s odlišnými výsledky – například poměrná plocha mezofylu vůči ploše příčného

řezu jehlicemi semenáčků *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco zůstala v EC nezměněna (Olszyk *et al.*, 2005) a v tohoročních jehlicích *Pinus sylvestris* L. byla dokonce tloušťka mezofylu na abaxiální straně jehlic při EC průkazně menší (Luomala *et al.*, 2005). Změny v zastoupení mezofylu na řezu jehlicí borovice však nemusejí být významné vzhledem k tomu, jak velkou část řezu zaujímají ostatní struktury (rev. Niinemets *et al.*, 2007).

Také celkové rozměry jehlic se mohou vlivem EC měnit, jako tomu bylo u *Pinus taeda* L. a *Pinus sylvestris* L., jejichž jehlice byly v EC tlustší, a to zejména kvůli nárůstu mezofylu (Thomas and Harvey, 1983; Lin *et al.*, 2001). Naopak u *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. ke změnám v tloušťce jehlic nedošlo (Eguchi *et al.*, 2004). Rozdílné výsledky jsou pravděpodobně dány odlišnými podmínkami pokusů, mezidruhovými rozdíly, odlišným stářím pozorovaných jedinců a také různou dobou pěstování rostlin v EC.

Byly prokázány rozdíly mezi výsledky krátkodobých a dlouhodobých pokusů, kdy semenáčky borovice bahenní *Pinus palustris* P. Mill. měly po 12 měsících působení EC tlustší jehlice než v AC, zatímco po 20 měsících v EC se tloušťka jehlic *Pinus palustris* P. Mill. mezi variantami prostředí nelišila (Pritchard *et al.*, 1998). Tyto výsledky naznačují, že po delší době v EC dochází k aklimaci rostlin na nové podmínky (Pritchard *et al.*, 1998). Tomu odpovídají údaje o semenáčcích borovice montereyské *Pinus radiata* D. Don., které měly po 22 týdnech v EC delší jehlice a větší průměr příčného řezu jehlicí než v AC (Conroy *et al.*, 1986) a o nezměněných rozměrech jehlic po třiletém (Apple *et al.*, 2000) a čtyřletém (Olszyk *et al.*, 2005) pěstování douglasky tisolisté *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco v EC.

Důsledky působení zvýšené [CO₂] také záleží na stáří rostlin, jak se ukazuje například při porovnání studií Lin *et al.* (2001) a Luomala *et al.* (2005), které obě zkoumaly vliv EC na anatomii jehlic borovice lesní *Pinus sylvestris* L. a trvaly 4 a 3 roky, avšak v první studii byly pozorovány na začátku pokusu tříleté stromy, zatímco ve druhé studii byly borovice na začátku pokusu staré přibližně 20 let. Mladší stromy vykazovaly na konci studie průkazné ovlivnění zkoumaných anatomických parametrů zvýšenou koncentrací CO₂, zatímco studie se staršími stromy neprokázala ovlivnění zkoumaných anatomických parametrů jehlic v EC; zde je však nutné podotknout, že borovice v první studii byly pěstovány první tři roky života v květináčích, zatímco druhá studie zkoumala borovice, které rostly od počátku volně v lese (Lin *et al.*, 2001; Luomala *et al.*, 2005).

Na formování struktury mezofylu spolupůsobí i další faktory prostředí, jako je množství dostupných živin: Při zvýšeném množství živin (dusíku, fosforu a draslíku) se v jehlicích *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. při zvýšené [CO₂] vyskytovalo více mezofylových buněk s výrazně menšími rozměry, zatímco v EC při sníženém množství živin bylo v jehlicích

méně mezofylových buněk větších rozměrů (Eguchi *et al.*, 2004). Změny v parametrech vnitřního povrchu mezofylu byly pravděpodobně důvodem pro pozorované změny rychlosti fotosyntézy, která vzrostla při EC a vysoké dostupnosti živin a poklesla při EC za nízké dostupnosti živin (Eguchi *et al.*, 2004).

Při zvýšené koncentraci CO₂ mohou mezofylové buňky obsahovat větší počet chloroplastů, což bylo zaznamenáno u *Arabidopsis thaliana* L. (Teng *et al.*, 2006) a *Nicotiana sylvestris* Speg. & Comes (Wang *et al.*, 2004). Také objem chloroplastů v pochvách cévních svazků kukuřice seté *Zea mays* L. měl trend být při EC větší (Thomas and Harvey, 1983). Některé studie nezkoumaly počet, ale plochu chloroplastů na řezu – v listech topolu osikovitého *Populus tremuloides* Michx. vzrostl v EC podíl plochy chloroplastů k ploše buněk na řezu listem (Oksanen *et al.*, 2001). Větší plochu chloroplastů na řezu listem měla v EC také bříza bělokorá *Betula pendula* Roth. (Oksanen *et al.*, 2005) a větší plocha chloroplastů na řezu jehlicí byla zaznamenána i u jehlic *Pinus palustris* P. Mill. po 12 měsících vystavení zvýšené koncentraci CO₂ (Pritchard *et al.*, 1997). Jehlice *Pinus palustris* P. Mill. vystavené EC po dobu 20 měsíců však měly v EC větší plochu chloroplastů na příčném řezu pouze v případě, kdy byly pěstovány při nedostatku dusíku a vody; v prostředí s dostatkem obou těchto látek nebyly rozdíly mezi koncentracemi CO₂ zaznamenány (Pritchard *et al.*, 1997).

2.3.3 Společný vliv koncentrace CO₂ a ozáření na fyziologické vlastnosti jehlic

Slunné a stinné jehlice reagují na zvýšenou koncentraci CO₂ rozdílně. V EC se může světelný kompenzační bod (tj. hodnota ozáření, při které jsou procesy příjmu a výdeje CO₂ v rovnováze) posunout na nižší hladinu ozáření a tím dovolí rostlinám růst ve větším stínu (rev. Korner, 2006). Výrazné rozdíly ve fotosynteticky aktivní radiaci ve svislém směru, typické v hustých lesních porostech (stinné dostávají o 11 % méně FAR než slunné (Sprtova and Marek, 1999), vedou ke změnám struktury a funkce asimilačního aparátu (Hattenschwiler, 2001) – například byly pozorovány různé parametry fluorescence chlorofylu *a* (Marek *et al.*, 2001). Stinné listy se přizpůsobují nedostatku FAR a vkládají svou energii zejména do stavby světlosběrných komplexů (Anderson *et al.* 1988 in Hrstka *et al.*, 2005, (Priwitzer *et al.*, 1998). Složení slunných listů naopak upřednostňuje složky, které podporují rychlé tempo elektronového transportu a fotofosforylace (Anderson *et al.* 1988 in Hrstka *et al.*, 2005, Spunda *et al.*, 1998). Tyto odlišnosti souvisí s odlišnými aktivitami důležitých

fotosyntetických enzymů, včetně enzymu Rubisco, což za normální koncentrace CO₂ následně vede k zdvojnásobení maximální

rychlosti karboxylace u slunných oproti stinným jehlicím (Špunda et al. 1998, Šprtová and Marek 1999). Celková in vitro aktivita enzymu Rubisco byla u jehlic smrku ztepilého v AC nižší než v EC. V AC byla aktivita Rubisco v jehlicích nejvyšší v nejvíce osvětlené, horní části koruny (ve 3. přeslenu) v porovnání s její střední částí (6. přeslen), kde byla o 11–15 % nižší a s jehlicemi z 9. přeslenu ve spodní, nejvíce zastíněné části koruny, kde byla o 44–56 % nižší než v dobře osvětlené horní části (Hrstka et al., 2005). Také Šprtová and Marek (1999) zaznamenali rozdíly 35–42 % mezi světlem saturovanou P_N mezi slunnými a stinnými jehlicemi. V EC byla aktivita Rubisca ve svrchní vrstvě (3. přeslen) vyšší o 8–13 % než ve střední (6. přeslen) a o 24–31 % (p<0.01) než ve spodní (9. přeslen), což byl průkazně menší rozdíl než mezi svrchní a spodní vrstvou u jehlic v AC (Hrstka et al., 2005). Aktivita Rubisca v průběhu vegetační sezóny poklesla v AC i v EC, její pokles v AC byl obdobný pro všechny ozářenosti v AC a byl mírnější než v EC, kde se směrnice křivky poklesu lišila mezi svrchními a spodními přesleny – u spodních byl pokles mírnější. Pokles aktivity Rubisca nesouvisel s obsahem N v listu (Hrstka et al., 2005).

Při dlouhodobém vystavení EC došlo u jehlic smrku ztepilého (*Picea abies* L. Karst.) k aklimační depresi účinnosti využití energie fotonů ve fotochemických reakcích fotosystému 2, avšak nedošlo k poškození reakčních center PS2 (Kalina et al., 2001). Byly zjištěny odlišné odpovědi slunných a stinných jehlic – stinné jehlice měly z EC díky stimulaci rychlosti elektronového transportu (ETR) větší prospěch než slunné, které již v AC dosáhly P_{Nmax} (Kalina et al., 2001). Spodní zastíněná část koruny v EC začala efektivněji spotřebovávat CO₂: Hodnoty P_{Nmax} u stinných jehlic v EC dosahovaly téměř 40 % hodnot u slunných jehlic v téže koncentraci, zatímco v AC dosahovala P_{Nmax} stinných jehlic pouze 25 % hodnoty slunných jehlic (Kalina et al., 2001) Hodnota maximální rychlosti čisté fotosyntézy P_{Nmax} byla průkazně vyšší pro slunné jehlice v porovnání se stinnými (Marek et al., 2002). Při EC byla prokázána stimulace asimilační aktivity (apparent asimilatory activity), a to nejvíce v hluboce zastíněných jehlicích v EC v husté části porostu (Marek et al., 2002).

V AC byly u slunných jehlic vyšší než u stinných tyto parametry: ETR rychlost elektronového transportu, fotochemická účinnost fotosystému 2 a NPQ nefotochemické zhášení (Marek et al., 2001). Působení EC neovlivnilo ETR u slunných jehlic, ale u stinných byla kapacita ETR dvojnásobně vyšší než u stinných v AC. U slunných jehlic v EC nastala strmější redukce fotochemické účinnosti fotosystému 2 a nefotochemického zhášení vlivem narůstající ozářenosti než u slunných jehlic v AC (Marek et al., 2001). V porovnání s AC

prudce klesl poměr mezi nefotochemickým zhášením SV_0 a NPQ u slunných jehlic v EC a narostl u stinných v EC. Stinné jehlice v EC měly větší schopnost udržet fotochemickou účinnost fotosystému 2 při ozáření nižších než $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a zabránit tak zvýšené redukci (over-reduction) reakčních míst PS2 (Marek *et al.*, 2001).

Vliv aplikace dusíkatého hnojiva na borovice kadidlové (*Pinus taeda* L.) zkoumali Maier *et al.* (2008): Borovice byly EC vystaveny po dobu 9 let a v posledním roce bylo na část z nich aplikováno dusíkaté hnojivo. Hnojené jehlice různého stáří akumulovaly N při hnojení, ale použily ho odlišně: Tohoroční jehlice ho použily pro tvorbu fotosyntetického aparátu, zatímco roční jehlice sloužily pouze jako skladiště dusíku (Maier *et al.*, 2008). Crous *et al.* (2008) měřili fotosyntézu, karboxylační kapacitu a koncentraci N vztaženou na plochu listu u borovice kadidlové pěstované v EC v půdě s omezenými zdroji dusíku, aby zjistili, zda dlouhodobé vystavení EC způsobuje pokles v počátečním nárůstu fotosyntézy a v obsahu N kvůli omezené úrodnosti půdy (Crous *et al.*, 2008). I zde byl rozdíl mezi tohoročními a ročními jehlicemi, kdy tohoroční jehlice na rozdíl od ročních alokovaly dusík do součástí fotosyntetického aparátu, takže u nich fotosyntetická kapacita nebyla ovlivněna na rozdíl od ročních jehlic, kde byla významně snížena (Crous *et al.*, 2008).

2.4 Metody pro odhad počtu chloroplastů v buňkách a listech

2.4.1 Způsob výběru vzorků a použitá metoda ovlivňuje výsledky měření

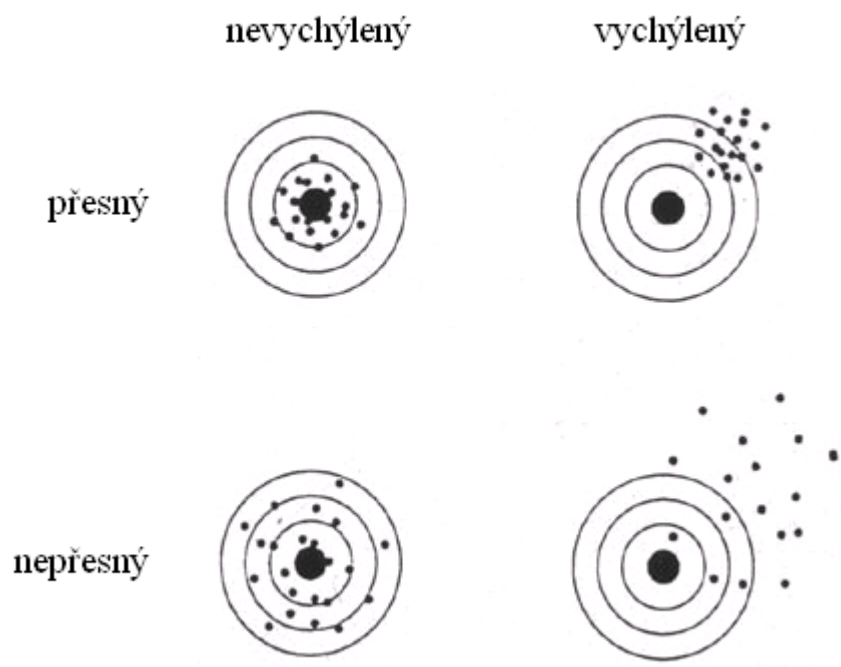
Reprezentativní výběr vzorků je důležitým předpokladem pro nevychýlený odhad anatomických parametrů, protože jsou běžné gradienty anatomických charakteristik v rámci rostlinného orgánu (Slavík, 1963 *in* Kubínová a Albrechtová, 1999; Pazourek, 1966 *in* Kubínová a Albrechtová, 1999; Kubínová, 1989 *in* Kubínová a Albrechtová, 1999; Pyke *et al.*, 1991 *in* Kubínová a Albrechtová, 1999). Z těchto důvodů je třeba používat systematicky rovnoměrně náhodný výběr vzorkovacích míst (Kubínová, 1993).

Vychýlenost a přesnost dosaženého odhadu závisí jednak na způsobu vzorkování (výběru polí), za druhé na použité metodě počítání a v neposlední řadě též na variabilitě zkoumaných parametrů (Kubínová, 1994). Nevychýleného a přesného výsledku je dosaženo při systematicky rovnoměrně náhodném vzorkování, použití nevychýlených metod a dostatečného počtu měření zohledňujícího variabilitu měřeného parametru. V případě použití vhodných metod, ale při velké variabilitě měřených parametrů se může dospět k nevychýlenému, ale nepřesnému výsledku. Použitím metod, které nezaručují nevychýlený

výběr vzorkovacích polí a metod počítání částic, při kterých nemají všechny částice stejnou pravděpodobnost, že budou vybrány, může být výsledek měření přesný (tj. s nízkou variabilitou), avšak vždy bude vychýlený v důsledku použití nevhodných metod. Možné výsledky odhadů jsou schematicky znázorněny na obr. 2.4.

Pokud je odhadován počet nebo velikost částic v ploše, částice jsou vybírány podle určitých pravidel pomocí vzorkovacích okének. Vybrané částice jsou potom spočítány nebo změřeny. Pravidla pro výběr částic vzorkovacími okénky v ploše musejí zaručovat jejich nevychýlené vzorkování, což znamená, že pokud by byla celá plocha orgánu pokryta těsně vedle sebe položenými vzorkovacími okénky, každá částice by byla vybrána právě jedním vzorkovacím okénkem (Kubínova, 1994). Vzorkovací okénko s rozšířenými vylučovacími čarami, které vymyslel Gundersen (1977) (obr. 3.1) umožňuje rovnoměrné vzorkování v ploše. Nevychýleného vzorkování a počítání částic v prostoru lze docílit použitím metody disektoru – viz další kapitoly (Sterio, 1984; Gundersen, 1986).

Nevychýleného odhadu počtu částic nelze dosáhnout spočítáním profilů částic na jediném řezu vzorkem, protože větší částice mají větší pravděpodobnost, že budou započítány (Sterio, 1984 *in* Kubínová a Albrechtová, 1999). Výsledek tak nezáleží jen na počtu, ale i na velikosti počítaných částic (rev. Kubínová a Albrechtová, 1999).



Obr. 2.5: Schematické znázornění vychýlenosti a přesnosti odhadů. Převzato a upraveno podle Mouton (2005) z http://www.ibro.info/Common/Docs/Images/3159/MoutonFig_10.jpg .

2.4.2 Počítání chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů

Jednou z nejstarších metod pro určení počtu chloroplastů, se kterou se v literatuře často setkáváme, je počítání chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů. Vzhledem k tomu, že chloroplasty leží ve svěracích buňkách téměř v jedné rovině, lze je jednoduše spočítat při pozorování preparátu stažené listové pokožky ve světelném mikroskopu. Jak ukázali Mochizuki a Sueoka (1955) u řepy *Beta vulgaris* L., počet chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů lze použít jako indikátor ploidie rostlin, protože s narůstající ploidií vzrůstá. Mochizuki a Sueoka (1955) obarvili preparát pro lepší rozlišení chloroplastů vodným roztokem dusičnanu stříbrného (AgNO_3). Jak uvádí Frandsen (1968), pro barvení chloroplastů se může použít též jodid draselný (KI), avšak pro rozlišení chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů lilku bramboru *Solanum tuberosum* L. a dalšího druhu bramboru *Solanum phureja* **Juz. & Buk.** nebylo žádné barvení nutné. Frandsen (1968) počítal chloroplasty vždy v 10 párech svěracích buněk ve vzorku. Tutéž metodu použili Pehu et al. (1987) ještě **po zhruba dvaceti letech** pro brambor (*Solanum phureja* **Juz. & Buk.**). Také Jacobs a Yoder (1989), kteří pozorovali spodní pokožku listu transformovaného rajčete jedlého *Lycopersicon esculentum* Mill. (aneb *Solanum lycopersicum* L.) pro určení ploidie, se odvolávají na Frandsena – preparát však obarvili 0,2% AgNO_3 . Stejně tak například Nicholson (1981) porovnával počty chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů, a to na nebarvených preparátech svrchní i spodní pokožky různých odrůd *Ranunculus ficaria* (též *Ficaria verna* Huds., orsej jarní). Qin a Rotino (1995), zjišťující stejný parametr u androgenických rostlin odvozených od různých genotypů papriky seté *Capsicum annum* L., Sari et al. (1999) zkoumající různě ploidní kultivary vodního melounu (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai.) a Yudanová et al. (2002) zabývající se řepou *Beta vulgaris* L. po téměř padesáti letech od prvního měření počtu chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů pro určení ploidie používali obdobné metody – sloupili spodní pokožku listu a vytvořili preparát, který pro lepší rozlišitelnost chloroplastů ošetřili 1% roztokem AgNO_3 a poté ho zkoumali ve světelném mikroskopu.

2.4.3 Počítání chloroplastů v izolovaných roztlačených mezofylových buňkách

Další metodou určování počtu chloroplastů v buňce je počítání chloroplastů v roztlakových preparátech mezofylových buněk. Possingham a Saurer publikovali r. (1969) následující metodu počítání chloroplastů: z listů špenátu setého *Spinacia oleracea* L. byly

vyříznuty disky, které byly zafixovány glutaraldehydem. Buňky pletiva byly poté od sebe odděleny přidáním 1M HCl. Possingham a Smith v roce (1972) zveřejnili vylepšenou metodu, kterou převzala řada dalších autorů: buňky byly odděleny působením 0,05M EDTA, čímž se docílilo lépe zachované struktury chloroplastů než při použití HCl, takže je šlo při počítání jednodušeji odlišit. Suspenze buněk byla poté přemístěna na podložní sklíčko a buňky byly rozmáčkнуты krycím sklíčkem, takže se z nich chloroplasty uvolnily. Počet chloroplastů v jednotlivých buňkách byl poté pomocí okulárové mřížky změřen v optickém mikroskopu s fázovým kontrastem. Z údajů v literatuře lze předpokládat, že suspenze byla tak řídká, aby bylo možné jednotlivé roztačené buňky od sebe odlišit.

Stejná metoda byla posléze použita pro počítání chloroplastů nejen v mezofylových buňkách listů špenátu setého *Spinacia oleracea* L. (Chaly *et al.*, 1980), ale též pšenice seté *Triticum aestivum* L. (Wardley *et al.*, 1984), merlíku bílého *Chenopodium album* L. (Yamasaki *et al.*, 1996) a řepy obecné *Beta vulgaris* L. (Tymms *et al.*, 1983).

Tutéž metodu převzali a mírně upravili (použili 0,1M EDTA, kterou nechali déle působit) Boffey *et al.* (1979), kteří ji použili pro počítání chloroplastů v buňkách pšenice *Triticum aestivum* L. vzdálených nejméně 2 cm od báze listu.

Stejně jako Boffey *et al.* (1979) postupovaly autorky Dean a Leech (1982) při zkoumání počtu chloroplastů v buňkách semenáčků pšenice seté *Triticum aestivum* L. Z této metody později vycházeli také Pyke a Leech (1991), kteří pro zkoumání mutantů huseničky rolního *Arabidopsis thaliana* L. doplnili metodu jodovým barvením a chloroplasty spočítali pomocí programu pro analýzu obrazu, ve kterém bylo možné jodidem obarvené chloroplasty s velkým množstvím škrobových zrn snadno segmentovat pomocí prahování a pak automaticky spočítat. Stejnou metodu použili v dalších studiích na *Arabidopsis thaliana* L. titíž (Pyke and Leech, 1992) i další autoři (Marrison *et al.*, 1999; Stettler *et al.*, 2009).

Podobnou metodu jako Possingham a jeho kolegové použila též Cattolico (1978) pro buňky řasy *Olisthodiscus* N. Carter, které byly nejprve odstředěny a poté rozředěny do suspenze s koncentrací 10^6 buněk/ml. Buňky v kapce suspenze byly krycím sklíčkem stlačeny do plochy, čímž byl vytvořen preparát, v němž bylo možné chloroplasty ve světelném mikroskopu snadno spočítat (Cattolico, 1978). Stejný postup počítání chloroplastů uvádějí i Molin *et al.* (1982) pro protoplasty izolované z listů tolíce seté neboli vojtěšky *Medicago sativa* L. a podobný postup použili též Lamppa *et al.* (1980) pro určení počtu chloroplastů buňkách hrachu setého *Pisum sativum* L., kteří izolovali buňky pomocí mírně upraveného postupu Possinghama a Saurera (1969).

2.4.4 Další metody počítání chloroplastů v celých izolovaných mezofylových buňkách

Počet chloroplastů v buňkách *Marchantia polymorpha* L. byl spočítán v optickém mikroskopu při postupném proostření celých jednotlivých buněk ze suspenze, přičemž příliš malé a příliš velké buňky nebyly do měření zahrnuty (Bockers *et al.*, 1997).

Ellis a Leech (1985) zkoumali počty chloroplastů vztažené na plochu řezu mezofylovými buňkami listů semenáčků pšenice *Triticum aestivum* L. a *Triticum monococcum* L. Příčné řezy listem byly zafixovány v glutaraldehydu s fosfátovým puffrem a poté macerovány v několika roztocích, až byly buňky pletiva od sebe odděleny. Suspenze byla potom pozorována optickým mikroskopem s použitím Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu, počet chloroplastů byl spočítán přímo v mikroskopu.

Kariya a Tsunoda (1971) uvádějí, že obarvili suspenzi buněk získanou z listů brukve řepáku *Brassica campestris* Auct. p.p., brukve zelné *Brassica oleracea* L. a brukve řepky *Brassica Napus* L. zeleným fluorescenčním barvivem FCF a spočítali chloroplasty ve světelném mikroskopu. Bližší okolnosti však k použitým metodám neuvádějí, takže nelze jednoznačně posoudit, zda mohli dospět k nevychýlenému výsledku.

Také Warner *et al.* (1987) pro zjištění počtu chloroplastů v buňkách prosa *Panicum virgatum* L. rozpustili listy na jednotlivé buňky. Z nich potom pod mikroskopem rozeznávali buňky mezofylu a buňky pochvy cévního svazku, ve kterých počítali chloroplasty. Opět není z jejich popisu metody jasné, zda počítali chloroplasty pouze v jedné rovině buňky, nebo zda buňky proostřovali celé nebo je rozmačkali, aby dostali chloroplasty do téže roviny.

2.4.5 Počítání chloroplastů v mezofylových buňkách z 2D řezu

Některé použité metody vzaly v úvahu prostorové rozložení chloroplastů uvnitř buněk a vyhnuly se nepřesnostem při odhadu počtu chloroplastů z počtu profilů na 2D řezu, jiné byly jednoznačně vychýlené.

Pro počítání chloroplastů v extrahovaných mezofylových buňkách listu rýže seté *Oryza sativa* L. byly vybrány jasně viditelné buňky, které byly vyfotografovány optickým mikroskopem s použitím Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu ve třech různých rovinách. Chloroplasty byly spočítány při porovnání fotografií ze všech tří rovin (Hassan and Wazuddin, 2000).

Dalším známým způsobem počítání chloroplastů je počítání profilů chloroplastů na řezech buňkami. Například Wang *et al.* (2004) počítali profily chloroplastů na řezech

buňkami *Nicotiana sylvestris* Speg. & Comes v transmisním elektronovém mikroskopu, také Teng *et al.* (2006) použili pro počítání chloroplastů v buňkách *Arabidopsis thaliana* L. snímky z transmisního elektronového mikroskopu, ale bližší okolnosti k metodě počítání neuvedli. Lze se tedy domnívat, že počítali pouze profily chloroplastů na řezu.

V některých studiích jsou uváděny výsledky měření počtu chloroplastů bez jakéhokoli bližšího přiblížení použitých metod počítání (Sam *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2006; Gopi *et al.*, 2008).

3. Materiál a metody

3.1 Experimentální stanoviště Bílý Kříž

Použitým materiálem byly jehlice smrku ztepilého *Picea abies* L. Karst., které byly odebrány z experimentálního ekologického stanoviště na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech.

3.1.1 Lokalita stanoviště

Experimentální stanoviště, patřící Laboratoři ekologické fyziologie rostlin Ústavu systémové biologie a ekologie, AV ČR v Brně (LEFR ÚSBE AV ČR, v.v.i.), se nachází na souřadnicích 49°30' s. š. a 18°32' v. d. v nadmořské výšce 908 m na jihojihozápadním svahu se sklonem 13°. V místě je chladné vlhké klima s hojnými srážkami: průměrná roční teplota na stanovišti dosahuje 4,9 °C, průměrná roční relativní vlhkost vzduchu je 80 %, průměrný roční úhrn srážek je 1100 mm a průměrný počet dní se sněhovou pokrývkou za rok činí 160. Matečnou horninu tvoří flyšové vrstvy s převahou godulského pískovce, typem půdy je mírný humusový podzol, textura půdy je hlinitá až písčitohlinitá se 30–40 % skeletu a půda dosahuje hloubky 60–80 cm (Urban *et al.*, 2001).

3.1.2 Lamelové sféry

Smrky ztepilé byly pěstovány ve dvou skleněných lamelových kultivačních sférách vybudovaných v roce 1997 (viz Obr. 3.1), v nichž byla pro experimentální účely udržována stanovená hladina koncentrace CO₂. Mimo sféry se nacházela ještě otevřená kontrolní plocha, avšak vzorky z ní odebrané nebyly v této práci použity, protože předchozí studie (Lhotáková *et al.* – manuskript) neprokázala významné ovlivnění rozdílů v anatomických parametrech mezi slunnými a stinnými jehlicemi z otevřené plochy a ze sféry s atmosférickou [CO₂].

Podmínky v kultivační sféře s atmosférickou koncentrací CO₂ mohou být odlišné od podmínek na otevřené kontrolní ploše kvůli tzv. komorovému efektu. Komorový efekt je soubor odlišností v podmínkách prostředí komory oproti podmínkám prostředí na otevřené ploše. Může zahrnovat odlišné proudění vzduchu, zamezení působení větru, změněné složení dopadajícího záření, mírně vyšší teplotu a rozdílnou relativní vlhkost vzduchu v komorách oproti volnému prostranství ve stejných klimatických podmínkách.

Velké části těchto ovlivnění bylo zamezeno díky použití speciálních kultivačních sfér s okny, jejichž otevřenost se přizpůsobovala aktuálním podmínkám vnějšího prostředí (Urban *et al.*, 2001). Intenzita dopadajícího záření, která byla ve sférách o 26 % nižší než na volné

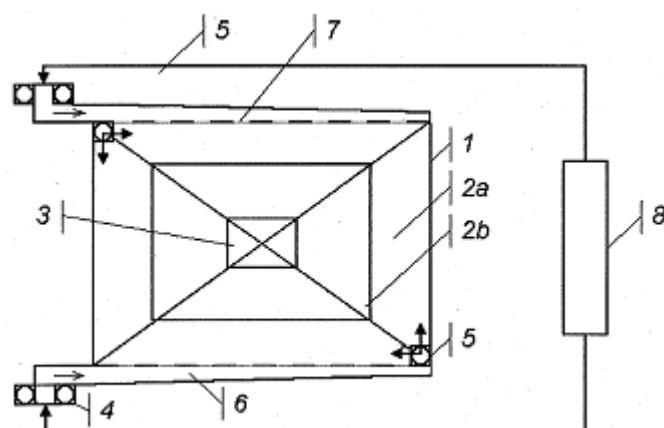
ploše, sice tvořila významný rozdíl mezi těmito prostředími, avšak při porovnání rozdílů ve studovaných anatomických parametrech stinných a slunných jehlic v rámci téhož prostředí a následném srovnání těchto rozdílů mezi oněmi dvěma prostředími nebyly pozorovány výrazné odlišnosti (Lhotáková *et al.* – manuskript). Proto jsme v této práci použili pouze vzorky z obou sfér a nikoli z otevřené kontrolní plochy.

Sféry o základně 10x10 m a výšce 7 m v nejvyšším bodě byly postaveny ze železné konstrukce ukotvené do betonových základů a vyplněné 72 ovladatelnými okny z bezpečnostního skla – viz Obr. 3.2. Okna v různých výškách bylo možné otevírat a sklápět v požadovaném úhlu nezávisle na sobě. Poloha oken byla řízena automaticky podle směru a rychlosti větru – okna byla vždy plně otevřena pokud rychlost větru dosahovala méně než 3 m.s⁻¹ a zcela se uzavřela při větru o rychlosti vyšší než 20 m · s⁻¹ (Urban *et al.*, 2001).

Uvnitř jedné sféry byla atmosférická koncentrace CO₂, která se v průběhu experimentu zvyšovala, a to z 357 μmol CO₂ · mol⁻¹ v roce 1997 až po 370 μmol(CO₂) · mol⁻¹ v roce 2004, zatímco vzduch ve druhé sféře byl za pomoci kanálků a ventilátorů obohacován oxidem uhličitým z přistavené cisterny tak, aby [CO₂] byla v této sféře o 350 μmol.mol⁻¹ vyšší než v první sféře. Ve druhé sféře byla tedy koncentrace CO₂ udržována na hladině okolo 700 μmol · mol⁻¹. Obohacování probíhalo v období vegetace (tj. od dubna do listopadu) nepřetržitě po celý den a po 91 % této doby byla hladina [CO₂] udržena mezi 600 a 800 μmol CO₂ · mol⁻¹. Vně i uvnitř sfér se nacházela čidla pravidelně zaznamenávající hodnoty různých faktorů prostředí jako je [CO₂], FAR, teplota a vlhkost (Urban *et al.*, 2001). Podrobnější popis experimentálního pracoviště lze nalézt v pracích Urban *et al.*, (2001) a Pokorný *et al.* - *manuskript*.



Obr. 3.1: Lamelové kultivační sféry na Bílém kříži v Beskydech. Převzato z <http://www.usbe.cas.cz/lefr/img/galerie/kultivacni_sfery/sfery_1.jpg>



Obr. 3.2: Schéma lamelové kultivační sféry – převzato z Urban *et al.* (2001): 1 – pevná skleněná stěna (2 m vysoká), 2 – skleněná stěna tvořená systémem otevíratelných oken, která se zavírala při rychlosti větru $3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (2a) a při $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (2b), 3 – pevný skleněný strop (1 m^2), 4 – radiální ventilátory (vzduch je přiváděn 3m komínou, takže teplý vzduch u země není přiváděn), 5 – přídavné ventilátory (500 W) pro turbulentní míchání, 6 – vzduchové kanálky, 7 – ventilační přívody se směrovacími lamelami, 8 – cisterna s CO_2 s rozprašovačem

3.1.3 Porost

Na stanoviště bylo v každé ze třech skupin o ploše $9 \times 9 \text{ m}$ (ve dvou sférách a na volné ploše) vysázeno 56 stromů smrku ztepilého *Picea abies* L. Karst., které byly jedinými dřevinami na stanovišti. Stromy byly při přesazení do sfér 12 let staré, průměrná výška stromu při přesazení na stanoviště byla $1,6 \pm 0,1 \text{ m}$ a průměrný průměr kmene ve výšce $0,3 \text{ m}$ byl $23 \pm 2 \text{ mm}$. Stromy byly na každou plochu vysázeny stejným způsobem, a to ve dvou různých hustých porostech: 34 stromů v hustotě 9300 ha^{-1} (LAI, index listové plochy od 0,8 do 0,9) a 22 stromů v hustotě 4900 ha^{-1} (LAI okolo 1,7); z těchto stromů vždy 26 jedinců tvořilo ochranné pásmo od kraje sféry (Urban *et al.*, 2001; Dobisová, 2005).

3.2 Pracovní postup a použité metody

3.2.1 Odběry vzorků

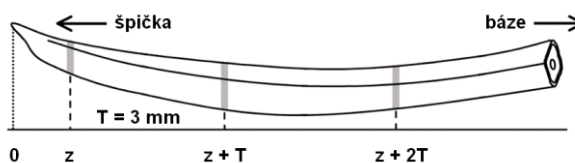
Pro tuto studii byly použity roční jehlice (jehlice nejmladšího ročníku) smrku ztepilého (*Picea abies* L. Karst.), které byly odebrány z experimentálního stanoviště v srpnu roku 2004. U každé ze dvou variant koncentrace CO_2 byly z korun stromů v řídkém porostu odebrány slunné jehlice ze třetího přeslenu a stinné ze šestého přeslenu (Dobisová, 2005). Za slunných dní dosahovala ozáření slunných jehlic $1000\text{--}1200 \mu\text{mol}(\text{fotonů}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, zatímco u stinných jehlic činila $300 \mu\text{mol}(\text{fotonů}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Lhotáková *et al.* – manuskript). Odebrané jehlice byly orientované na jih a jihozápad (Lhotáková *et al.* – manuskript), přičemž – jak bylo prokázáno (Lhotáková *et al.*, 2007) – orientace jehlic na určitou světovou

stranu nemá na jejich fyziologické a anatomické vlastnosti vliv. Celkem bylo odebráno od každé ze 4 variant (slunné AC, stinné AC, slunné EC, stinné EC) po pěti vzorcích, a to pouze z lamelových sfér, protože rozdíly ve fotosyntetických parametrech jehlic (A_{\max} , AQE a R_D) mezi kontrolním stanovištěm a skleníkem s AC nebyly průkazné (Lhotáková *et al.*, manuskript). Porovnání výsledků z experimentů jako je tento je možné díky principu pseudoreplikace – každý strom byl považován za replikační jednotku (Hurlbert, 1984).

Ihned po odběru byly jehlice uloženy do přenosného mrazícího boxu a poté byly dlouhodobě skladovány při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lhotáková *et al.* – manuskript). Zmrazení vzorků pro následnou analýzu anatomické struktury jehlic se již dříve ukázalo jako vhodné (Lhotáková *et al.*, 2008).

3.2.2 Snímání obrazových dat konfokálním mikroskopem

Z jehlic bylo systematicky rovnoměrně náhodným způsobem odebráno několik segmentů, to znamená, že byly rozmístěny rovnoměrně po celé délce jehlice a jejich poloha byla náhodně vybrána při zachování konstantní vzdálenosti po sobě následujících řezů. Nejprve byla určena průměrná délka jehlic (cca 15 mm), z níž byla odvozena optimální vzdálenost mezi segmenty jako vzdálenost 3 mm. Příčné řezy byly vedeny pomocí ručního mikrotomu. Pomocí tabulky náhodných čísel bylo zvoleno náhodné celé číslo v rozmezí 0 až 5, které určilo vzdálenost polohy prvního příčného řezu (z) od špičky jehlice – viz Obr. 3.3. Náhodné číslo 0 odpovídalo vzdálenosti 0,5 mm, náhodné číslo 1 vzdálenosti 1 mm atd. až k náhodnému číslu 5, které určilo vzdálenost prvního řezu 3 mm od špičky jehlice. Následující řezy byly provedeny vždy ve vzdálenosti $T = 3\text{ mm}$ od předchozího místa řezu, dokud nebylo dosaženo báze jehlice. Počty pozorovaných segmentů v jehlici závisely na délce jehlice, na jehlici průměrně připadly 4 segmenty. V každém místě řezu bylo odříznuto pět řezů o tloušťce 0,2 mm, ze kterých byl vždy jeden optimální vybrán pro nasnímání mikroskopem. Důvodem pro toto počínání bylo, aby případný nepovedený řez nezhatil časově náročné snímání celé jehlice.



Obr. 3.3: Systematicky rovnoměrně náhodně zvolená místa řezů pro snímání mikroskopem: z – vzdálenost prvního příčného řezu od špičky jehlice, T – vzdálenost mezi následujícími místy řezů. Upraveno podle Lhotáková *et al.* (2008)

3.2.2.1 Příprava preparátů a nastavení mikroskopu

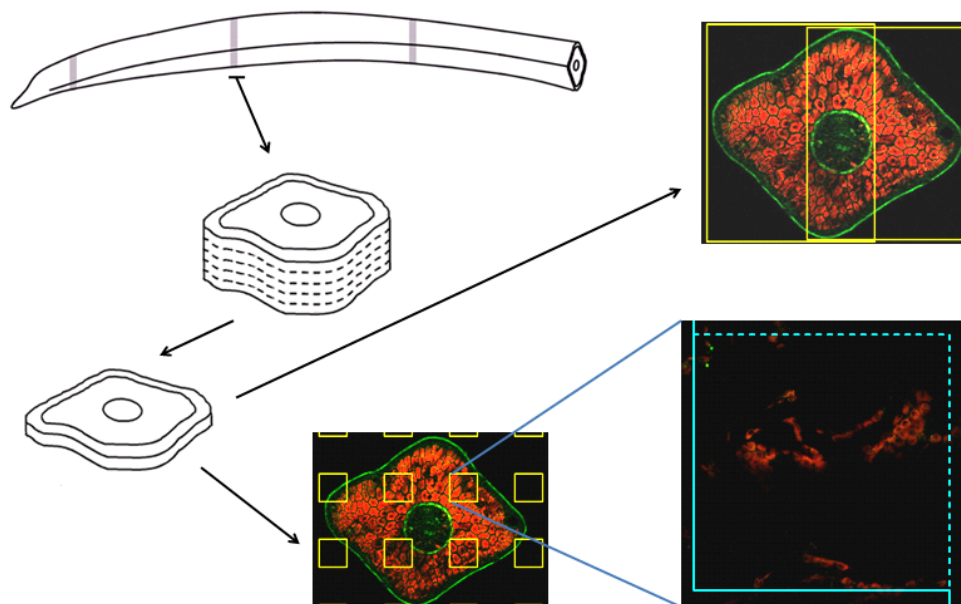
Řezy byly umístěny do kapky destilované vody a byl vytvořen dočasný preparát. Preparáty nebylo třeba pro snímání nijak upravovat vzhledem k autofluorescenci chlorofylu v chloroplastech a fenolických látek vázaných ve vakuolách a v buněčných stěnách.

Pro snímání byl použit laserový konfokální mikroskop Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Byla zvolena excitace argonovým laserem o vlnové délce 488 nm. Autofluorescence fenolických látek v buněčných stěnách byla detekována v zeleném kanálu v rozmezí vlnových délek 494–577 nm a autofluorescence chlorofylu v chloroplastech byla detekována v červeném kanálu v emisním spektru 625–710 nm.

3.2.2.2 Postup snímání mikroskopem

Každý studovaný řez jehlicí byl nejprve celý nasnímán při menším zvětšení, následně byly nasnímány série optických řezů (pro odhad počtu buněk), které pokryly celý řez a nakonec byla systematicky rovnoměrně náhodně zvolena místa, ve kterých byly nasnímány série optických řezů při velkém zvětšení (pro odhad počtu chloroplastů). Schéma postupu snímání je znázorněno na obr. 3.4.

Nejprve byl pomocí suchého planapochromatického objektivu 10× (NA – numerická apertura 0,4) při rozlišení 1024 × 1024 pix nasnímán celý příčný řez jehlicí. Poté byl použit planapochromatický objektiv 20× (NA 0,7) s vodní imerzí, kterým bylo při rozlišení 2048 × 2048 pix nasnímáno několik sérií optických řezů vedle sebe tak, aby byl zachycen celý řez. Nasnímané série optických řezů měly tloušťku 30 μm, přičemž optické řezy byly od sebe vzdáleny 2 μm.



Obr. 3.4: Schéma postupu (kresba jehlice byla upravena podle Lhotákové et al. (2008): Z pěti řezů v systematicky rovnoměrně náhodně vybraném místě řezu byl jeden řez vybrán a nasnímán. Nejprve byl pořízen jeden snímek objektivem 10× a poté série optických řezů objektivem 20× (příklad ohraničení sérií pro pokrytí celého řezu je znázorněn žlutými obdélníky na snímku vpravo nahoře). Následně byla na snímek pořízený objektivem 10× v programu *Ellipse* systematicky rovnoměrně náhodně přiložena mřížka (mikroskopický snímek vlevo dole) a v místech vybraných polí byly nasnímány série optických řezů objektivem 63×. Tyto série byly posléze použity pro měření hustoty chloroplastů v jehlici pomocí modulu Disector v programu *Ellipse* – na obrázku vpravo dole je znázorněno vzorkovací okénko sondy disektoru.

Nakonec byly planapochromatickým objektivem 63× (NA 1,2) s vodní imerzí při dvojnásobném zvětšení (tj. zoom 2) a rozlišení 512×512 pix nasnímány série optických řezů o tloušťce $20 \mu\text{m}$ se vzdáleností řezů $0,5 \mu\text{m}$. Podrobný postup je zařazen v kapitole (výsledky).

3.2.3 Analýza získaných obrazových dat

3.2.3.1 Délka jehlice, odhad objemu jehlice a mezofylu a objemového podílu mezofylu

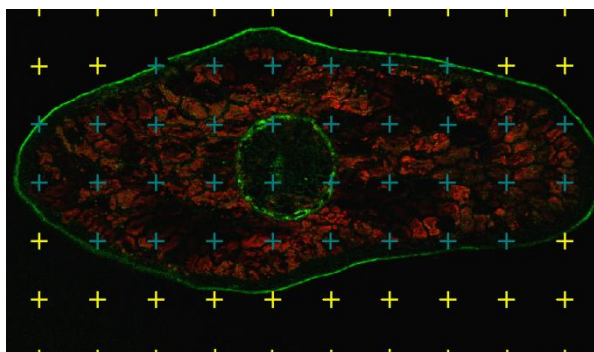
Délka jehlice $L(jehl)$ [mm] byla stanovena měřítkem. Odhad objemu jehlice $estV(jehl)$ [mm^3] byl získán pomocí upraveného Cavalieriova principu. Cavalieriho princip pro odhad objemu objektu z příčných řezů vedených objektem spočívá v odhadu plochy každého řezu objektem (např. pomocí bodové metody) a v následném součinu celkové plochy všech řezů a vzdálenosti dvou následných řezů, přičemž všechny řezy jsou od sebe stejně vzdáleny (Gundersen and Jensen, 1987; Michel and Cruzorive, 1988 in Kubínová a Albrechtová, 1999). V této práci byla použita pozměněná metoda (viz rovnice 1) – objem jehlice byl odhadnut

vynásobením délky jehlice průměrnou plochou řezu dané jehlice, přičemž odhad plochy řezu $estA(\text{řez})$ byl určen bodovou metodou pomocí modulu PointGrid v programu *Ellipse*.

$$estV(jehl) = \overline{estA(\text{řez})} \cdot L(jehl) \quad (1)$$

Odhad obsahu plochy pomocí bodové metody (Weibel, 1979 in Kubínová a Albrechtová, 1999) spočívá ve spočítání bodů náhodně přiložené testovací mřížky, které se nacházejí uvnitř měřeného útvaru – viz Obr. 3.3 a rovnice (2), kde $estA(\text{řez})$ je odhad plochy řezu, P je celkový počet testovacích bodů mřížky v měřeném objektu a a je plocha odpovídající jednomu testovacímu bodu mřížky.

$$estA(\text{řez}) = P \cdot a \quad (2)$$



Obr. 3.3: Přiložení testovací bodové mřížky v modulu PointGrid v programu *Ellipse* na řez jehlicí pořízený objektivem 10x. Modré křížky jsou body, které se nacházely v řezu jehlicí, žluté body se nacházely mimo objekt a nebyly započítány do výpočtu plochy.

Analogicky byla odhadnuta též plocha mezofylu na řezu $estA(\text{mez})$. Odhad objemového podílu mezofylu $estV_v(\text{mez})$ byl vypočítán z podílu plochy mezofylu na ploše řezu (3). Tato metoda již byla dříve navržena pro listy trav a bifaciální listy (Kubínová, 1993).

$$estV_v(\text{mez}) = \frac{estA(\text{mez})}{estA(\text{řez})} \quad (3)$$

Odhad objemu mezofylu $estV(\text{mez})$ byl vypočítán jako součin odhadu objemového podílu mezofylu a odhadu objemu jehlice:

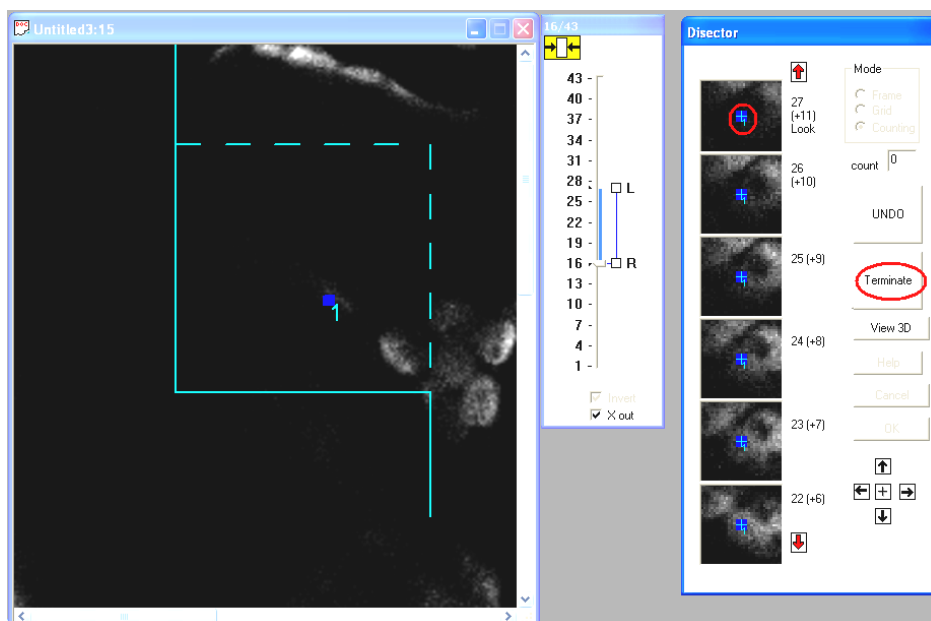
$$estV(\text{mez}) = estV_v(\text{mez}) \cdot estV(jehl) \quad (4)$$

3.2.3.2 Odhad hustoty mezofylových buněk a chloroplastů v jehlici a v mezofylu, odhad počtu chloroplastů na mezofylovou buňku, odhad objemu mezofylových buněk

Metoda optického disektoru umožňuje nevychýlený odhad hustoty částic, tj. počtu částic v prostoru, přičemž všechny částice nezávisle na jejich velikosti a tvaru mají stejnou pravděpodobnost, že budou vybrány (Sterio 1984, Gundersen, 1986, Gundersen and Jensen, 1987; West and Gundersen, 1990). Prostorová sonda disektoru umožňuje rovnoměrně náhodné vzorkování oblastí pro počítání částic nezávisle na jejich velikosti a tvaru. Sonda má tvar kvádra, kdy dvě rovnoběžné stěny jsou referenční a náhledová rovina, další dvě na ně kolmé a spolu sousedící stěny jsou stěnami, ve kterých se protnuté částice započítávají a poslední dvě roviny kvádra jsou vylučovací. Z kvádra vystupují dvě další roviny, které jsou také vylučovací (částice, které se jich dotknou, se nezapočítají (modul disektor v programu *Ellipse* je na obr. 3.1). Započítávají se vrcholky částic ležící mezi referenční a náhledovou rovinou, tedy částice, které byly zasaženy pouze referenční a nikoli náhledovou rovinou a také částice, které se nacházejí uvnitř sondy a nedotýkají se vylučovacích rovin. Pro počítání chloroplastů a buněk v jehlici byl použit modul Disector v programu *Ellipse* (ViDiTo, Košice), ve kterém je možno postupně proostřit optické řezy ze série nasnímané konfokálním mikroskopem a spočítat tak částice, které jsou vybrány náhodně umístěnou sondou. Díky známému objemu sondy se posléze spočítala početní hustota chloroplastů v dané sondě a na závěr se vyhodnotila data ze všech příslušných sond.

Odhad hustoty chloroplastů v jehlici (neboli odhad počtu chloroplastů na objem jehlice) $estN_{Vjehl}(chl)$ a odhad hustoty mezofylových buněk v jehlici $estN_{Vjehl}(mez.b.)$ byly určeny s využitím metody optického disektoru – modul Disector v programu *Ellipse* (obr. 3.1). Podrobné nastavení je blíže popsáno v kapitole Výsledky. Odhad hustoty chloroplastů v jehlici byl vypočítán podle vzorce (5), kde $suma Q_i$ je součet všech započítaných chloroplastů ve všech sondách disektoru v jehlici, $suma P_i$ je součet všech započítaných testovacích bodů mřížek pro výpočet objemu jehlice v sondě disektoru, p je celkový počet testovacích bodů mřížky ve vzorkovacím okénku sondy, a je plocha vzorkovacího okénka disektoru a h je výška disektoru.

$$estN_{Vjehl}(chl) = \frac{\sum_{i=1}^n Q_i}{\sum_{i=1}^n P_i} \cdot \frac{p}{a \cdot h} \quad (5)$$



Obr. 3.1: Modul Disector v programu *Ellipse* – ukázka jeho použití pro počítání chloroplastů v jehlici na sérii optických řezů z konfokálního mikroskopu. Čtverec vymezuje sondu disektoru – plné čáry jsou průsečnicemi vylučovacích stěn sondy a vylučovacích rovin s rovinou optického řezu. Patříčné rozměry, výšku sondy (počet optických řezů) a její umístění je třeba nastavit, nastavení lze uložit a posléze vyvolat. Postup měření: Částice je manuálně vybrána v rovině, kde se poprvé objeví, a poté je manuálně označena ve všech dalších rovinách. Pokud skončí před dosažením vylučovací roviny sondy, je automaticky započítána. Pokud se dotkne vylučovacích rovin – těch, které jsou znázorněny plnou čarou nebo poslední roviny (konce sondy), započítána není. Program umožňuje prohlížení několika následujících rovin a automatické odlišení započítávaných a nezapočítávaných částic, v poli „count“ se zobrazuje celkový součet započítávaných částic.

Odhad hustoty mezofylových buněk v jehlici $estN_{Vjehl}(mez.b.)$ byl vypočítán analogicky jako $estN_{Vjehl}(chl)$. Odhad hustoty chloroplastů v mezofylu $estN_{Vmez}(chl)$ byl vypočítán podle vzorce:

$$estN_{Vmez}(chl) = \frac{estN_{Vjehl}(chl)}{estV_v(mez.b.)} \quad (6)$$

Odhad počtu chloroplastů na mezofylovou buňku $estN_{Nmez.b.}(chl)$ byl odvozen z odhadu hustoty mezofylových buněk v jehlici $estN_v(mez.b.)$ a odhadu hustoty chloroplastů v jehlici $estN_v(chl)$ podle vzorce:

$$estN_{Nmez.b.}(chl) = \frac{estN_{Vjehl}(chl)}{estN_{Vjehl}(mez.b.)} \quad (7)$$

Odhad hustoty buněk v mezofylu $estN_{vmez}(mez.b.)$ byl odvozen z hustoty mezofylových buněk v jehlici a z objemového podílu mezofylu podle vzorce:

$$estN_{vmez}(mez.b.) = \frac{estN_{vjehl}(mez.b.)}{estV_v(mez)} \quad (8)$$

3.2.4 Měření fotosyntetických parametrů

Měření rychlosti čisté asimilace CO_2 v závislosti na dopadajícím záření v intervalu od 1500 do 0 $\mu\text{mol}(\text{fotonů}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ provedli kolegové z ÚSBE AV ČR pod vedením Prof. RNDr. Ing. Michala V. Marka, DrSc., Mgr. Otmaru Urbana, PhD. a Mgr. Mirky Šprtové, PhD. pomocí analyzátoru výměny plynů CIRAS-1 (PP Systems, U.K.) s umělým zdrojem světla v podobě dvou halogenových lamp o příkonu 25 W. Měření byla provedena na nedotčených výhonech všech čtyř variant za konstantních mikroklimatických podmínek (teplota jehlic činila 20 ± 2 °C a relativní vlhkost vzduchu byla 55 ± 3 %); při měření byly dodrženy rozdíly v koncentraci CO_2 mezi variantami s normální a zvýšenou koncentrací (Lhotáková *et al.* – manuskript). Z naměřených dat získali světelné křivky fotosyntézy, které vyjadřovaly závislost rychlosti asimilace CO_2 na dopadajícím záření. Z nich posléze určili A_{max} – světlem saturovanou rychlost asimilace CO_2 při růstové koncentraci CO_2 (tj. 380 nebo 700 ppm) a intenzitě světla větší než $1200 \mu\text{mol}(\text{fotonů}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, AQE – zdánlivou kvantovou účinnost, tj. směrnici počáteční lineární fáze (při ozáření $0-250 \mu\text{mol}(\text{fotonů}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) světelné křivky fotosyntézy při růstové koncentraci CO_2 ($\text{mol}(CO_2) \cdot \text{mol}(\text{fotonů})^{-1}$) a R_D – rychlost temnostní (mitochondriální) respirace ($\mu\text{mol}(CO_2) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

3.2.5 Použité statistické metody

Pro statistické vyhodnocení byl použit program NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA). Rozdílnost dat byla porovnávána analýzou rozptylu ANOVA, v případě normálního rozdělení hodnot byl použit Tukey-Kramerův mnohonásobně porovnávací test, který porovnává průměry, a pokud nebyla splněna podmínka normálního rozdělení, která je pro použití Tukey-Kramerova testu nezbytná, byl použit Kruskal-Wallisův mnohonásobně porovnávací test, který porovnává mediány a podmínku normálního rozdělení nevyžaduje. Použitý test je uveden pod každým grafem.

4. Výsledky

4.1 Vypracování metodiky pro zjištění nevychýleného odhadu hustoty chloroplastů a buněk v mezofyly jehlic s použitím metody disektoru

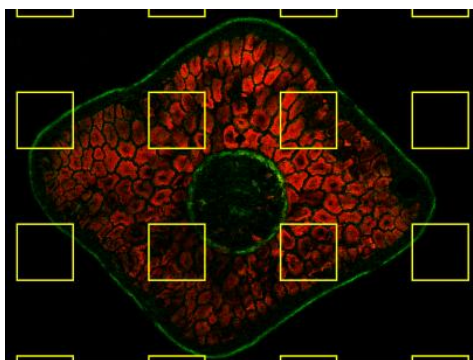
Metoda disektoru nebyla pro počítání chloroplastů na řezech mezofylovými buňkami dosud použita. Proto bylo třeba metodiku nejdříve upravit. Předchozí studie (Albrechtová *et al.*, 2007) se zaměřila na úpravu původní metodiky pro použití metody disektoru pro počítání buněk. V této studii bylo třeba upravit metodiku – především snímání řezu a umístění pozorovacích polí v rámci fyzického řezu – za účelem počítání chloroplastů.

Bylo třeba optimálně nastavit rozlišení a zvětšení (zoom) tak, aby nasnímání celé jehlice bylo časově zvládnutelné během jednoho dne a aby zároveň byla nasnímaná data dostatečně kvalitní a umožňovala provedení obrazových analýz. Pro snímání celých řezů jehlicemi objektivem 10× jsme nastavili rozlišení na 1024×1024 pix. Pro snímání sérií pro počítání buněk objektivem 20× jsme museli zvolit rozlišení 2048×2048 pix a dvojnásobné průměrování, abychom získali snímky s dobře odlišitelnými buněčnými stěnami mezofylových buněk. Pro snímání sérií pro počítání chloroplastů jsme nakonec zvolili snímání objektivem 63× při zoomu 2 a rozlišení 512×512 pix se vzdáleností 0,5 μm mezi optickými řezy. Toto nastavení umožnilo získat série optických řezů vhodné pro měření počtu chloroplastů v programu *Ellipse* (ViDiTo, Košice).

Místa snímání sérií byla určena systematicky rovnoměrně náhodně přiložením čtvercové mřížky na snímek řezu získaný objektivem 10× v modulu Rectangles v softwaru *Ellipse* (ViDiTo, Košice, SR) – viz obr. 4.1. Velikost čtverců byla stanovena na 75×75 pix, aby přibližně odpovídala velikosti mikroskopem snímaného pole, souřadnice levého horního rohu prvního čtverce byly pro každý řez náhodně zvoleny za pomoci tabulky náhodných čísel. Protože plocha řezu slunnými jehlicemi v AC byla větší než plocha řezu stinnými jehlicemi a pro odlišný tvar řezu těchto jehlic, byla na počátku snímání zvolena odlišná vzdálenost čtverců v příkládané mřížce pro slunné a stinné jehlice: pro slunné jehlice činila 235×235 pix a pro stinné byla vzhledem k jejich protáhlejšímu tvaru na řezu určena vzdálenost 200×150 pix. Přestože se v průběhu snímání ukázalo, že slunné jehlice v EC mají podobný tvar jako stinné v EC i AC (viz obr. 4.3, parametr neměřen), odlišná vzdálenost vzorkovacích polí neměla vliv na průměrný počet polí na jehlici – nelišil se mezi variantami. V jedné jehlici bylo průměrně nasnímáno 25 sérií optických řezů pro odhad hustoty chloroplastů v jehlici.

Nastavení velikosti základny sondy disektoru pro počítání chloroplastů bylo 500×500 pix a výška sondy byla vymezena 12 středními optickými řezy série, výška sondy tedy činila

přibližně 5,5 μm . Nastavení velikosti základny sondy disektoru pro počítání buněk bylo nastaveno individuálně tak, aby všechny sondy postupně pokryly celou plochu řezu, na několikrát nasnímanou objektivem 20 \times , výška sondy byla přibližně 20 μm při použití oboustranného disektoru (fyzická výška disektoru byla přibližně 10 μm , byla vymezena středními šesti řezy série). Metoda oboustranného disektoru spočívá v počítání částic, které v sondě skončily, i těch, které se v sondě disektoru objevily a protuly a výška disektoru je v tomto případě započítána dvakrát.



Obr. 4.1: Výběr polí pro snímání sérií objektivem 63x v modulu Rectangles v programu *Ellipse*. Mřížka byla na snímek přiložena systematicky rovnoměrně náhodně – byly zvoleny náhodné souřadnice pro umístění první čtverce.

4.2 Metoda odhadu objemu jehlice

Vzhledem k řezání pěti řezů v každém místě řezu a následném vybrání vhodného řezu pro snímání jsme museli upravit metodu odhadu objemu jehlice. Výběr jednoho z řezů z místa řezu totiž porušil předpoklad konstantní vzdálenosti řezů tělesem nutný pro použití Cavalierova principu, kdy se ze součtu ploch všech řezů vynásobeného délkou tělesa získá odhad objemu tělesa. Odhad objemu jsme tedy vypočítali vynásobením průměrné plochy řezu délkou jehlice (Kubínová et al., 2002).

Za tímto účelem byl určen odhad plochy celého řezu jehlicí v modulu PointGrid u necelých 80 řezů jehlicemi. Při té příležitosti byla též stejnou metodou určena plocha mezofylu na řezu jehlicí.

4.3 Anatomické charakteristiky slunných a stinných jehlic pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂

4.3.1 Anatomický popis jehlic, řezů, rozdíl tvaru na řezu slunnými a stinnými jehlicemi

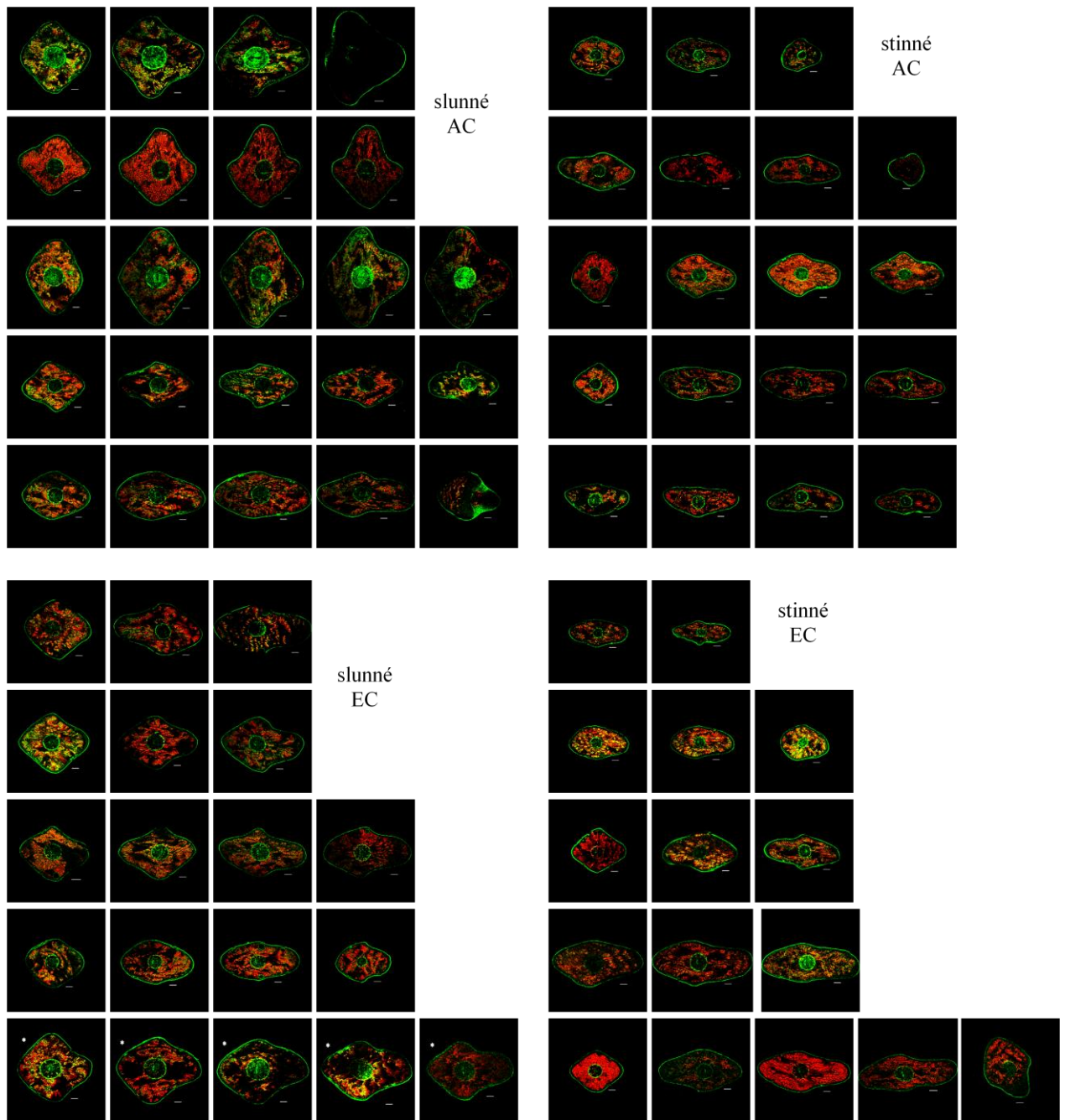
Jehlice měly na příčném řezu rozmanité tvary (obr. 4.2). Tvar jehlic na řezu nebyl z časových důvodů nijak kvantifikován (měřen), ale na získaných snímcích se tvar slunných jehlic v AC jeví jako spíše odlišný od tvaru stinných jehlic v AC a tvar slunných jehlic v EC se jeví jako málo odlišný od tvaru stinných jehlic v EC. Tvary na řezu jsou však i v rámci téže varianty prostředí proměnlivé.

4.3.1 Kvantitativní analýza

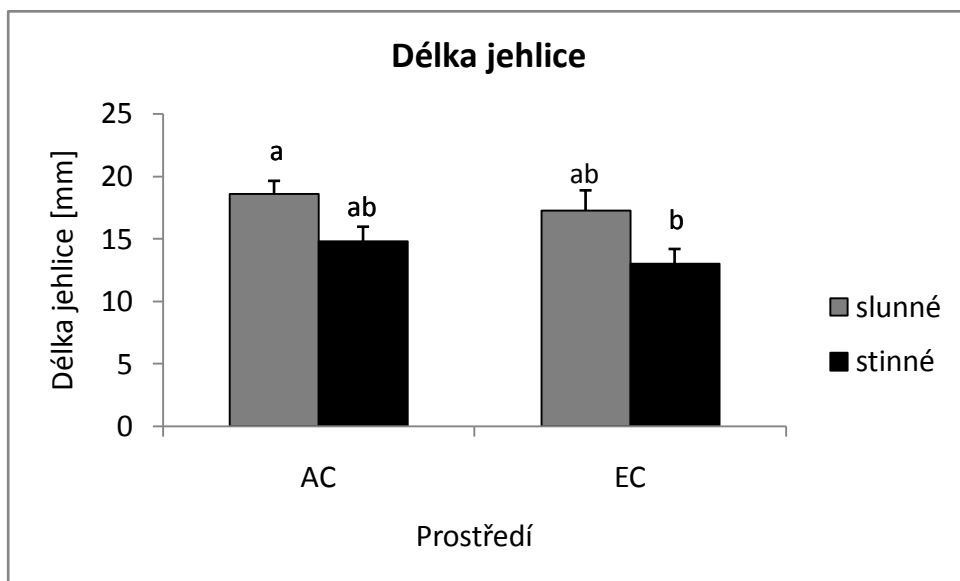
Hodnoty anatomických parametrů jehlic smrku ztepilého byly často proměnlivé i v rámci téže varianty prostředí. Obecným trendem byly rozdíly v anatomických charakteristikách mezi slunnými a stinnými jehlicemi v normální koncentraci CO₂ a oproti nim neprůkazné rozdíly v týchž charakteristikách při porovnávání slunných a stinných jehlic ve zvýšené koncentraci CO₂. Slunné a stinné jehlice v EC tak byly od sebe méně odlišné než tomu bylo u slunných a stinných jehlic v AC.

Průměrné hodnoty naměřených délek jehlic $L(jehl)$ jsou uvedeny na obr. 4.3. Porovnání slunných a stinných jehlic v rámci téže varianty vykazuje trend k větší délce slunných jehlic, avšak jediným průkazným rozdílem byl rozdíl mezi vyšší průměrnou délkou slunných jehlic v normální koncentraci CO₂ a nižší průměrnou délkou stinných jehlic ve zvýšené koncentraci CO₂.

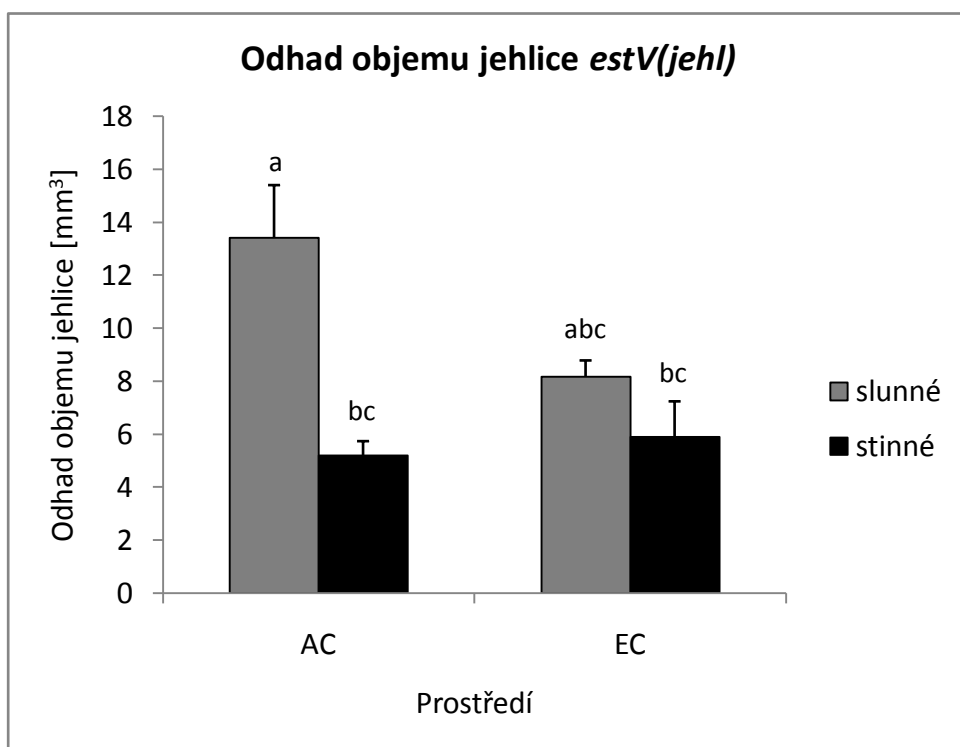
Odhadnutý objem jehlic $estV(jehl)$ byl průkazně větší u slunných jehlic v AC v porovnání se stinnými jehlicemi v téže koncentraci CO₂ a se stinnými jehlicemi v EC (obr 4.4). Odhad objemu slunných jehlic v EC nebyl průkazně odlišný od odhadu objemu v ostatních variantách, tedy ani od objemu stinných jehlic v EC. Stejně tak odhad objemu mezofylu v jehlici $estV(mez)$ byl průkazně větší u slunných jehlic v AC v porovnání se stinnými jehlicemi v obou koncentracích (obr 4.5), podíl mezofylu $estV_V(mez)$ se však ve všech vzájemně porovnávaných variantách průkazně nelišil (obr. 4.6).



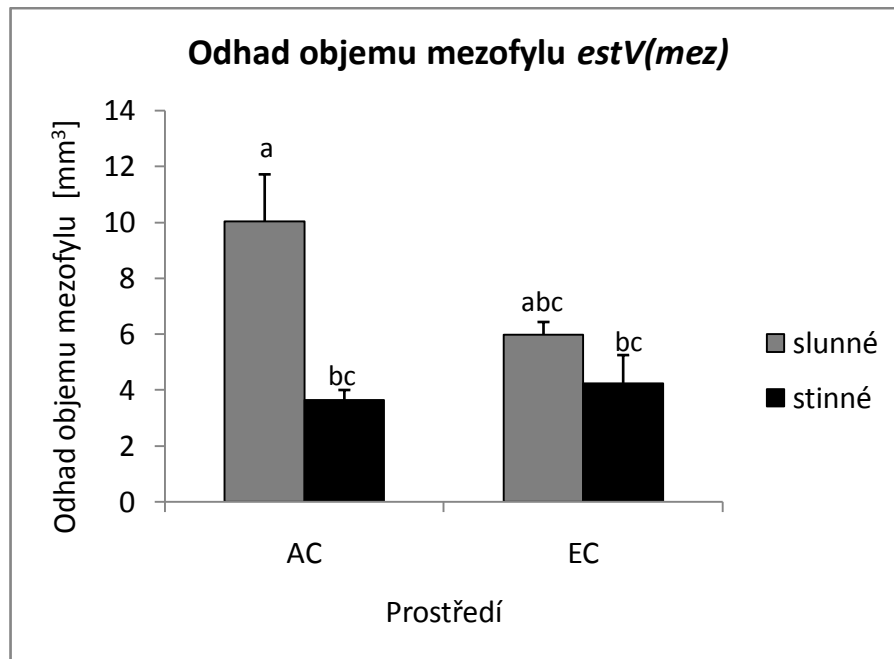
Obr. 4.2: Snímky příčných řezů jehlicemi nasnímané konfokálním mikroskopem objektivem 10x. V každém kvadrantu se nacházejí řezy z jedné varianty prostředí: Vlevo nahoře slunné AC, vpravo nahoře stinné AC, vlevo dole slunné EC a vpravo dole stinné EC. Každý řádek v rámci kvadrantu zahrnuje řezy z jedné jehlice, řezy jsou řazeny zleva od špičky jehlice. Vzdálenost mezi řezy byla 3 mm, počáteční místo řezu bylo určeno náhodně v rozmezí 0,5 až 3 mm. Bílé úsečky značí vzdálenost 100 μm . Jedna celá jehlice, jejíž řezy jsou ve spodním řádku slunných EC (označené hvězdičkou) nebyla do měření zahrnuta kvůli chybě při snímání sérií.



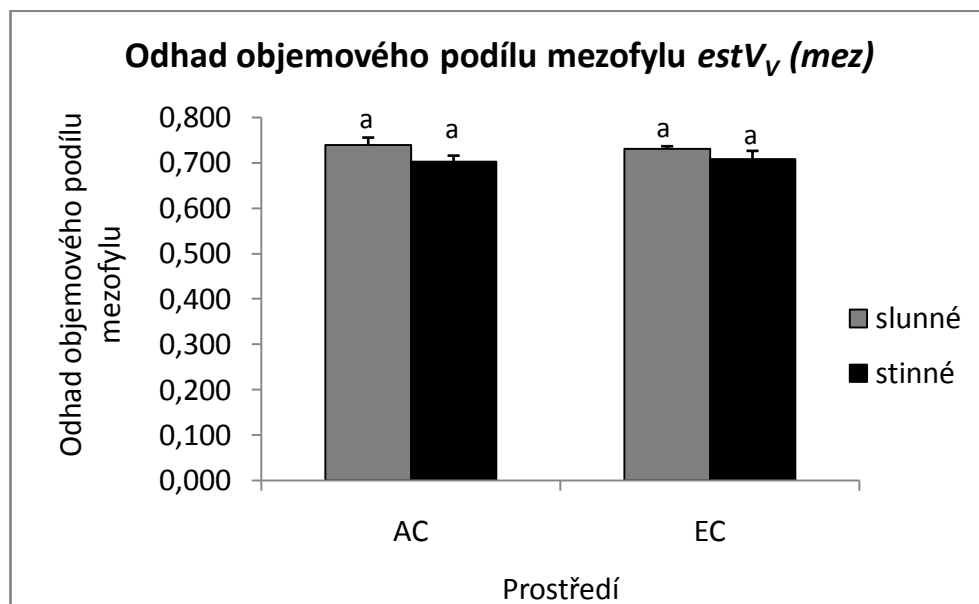
Obr. 4.3: Sloupcový graf porovnání délek jehlic v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny délky jehlic v každé variantě prostředí. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic (n = 5), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 (n = 4). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot mediánů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Kruskal-Wallisova testu mezi sloupci označenými shodnými písmeny nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti p = 0,05.



Obr. 4.4: Sloupcový graf porovnání odhadů objemu jehlic v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady objemu jehlice. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic (n = 5), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 (n = 4). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot mediánů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Kruskal-Wallisova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti p = 0,05.



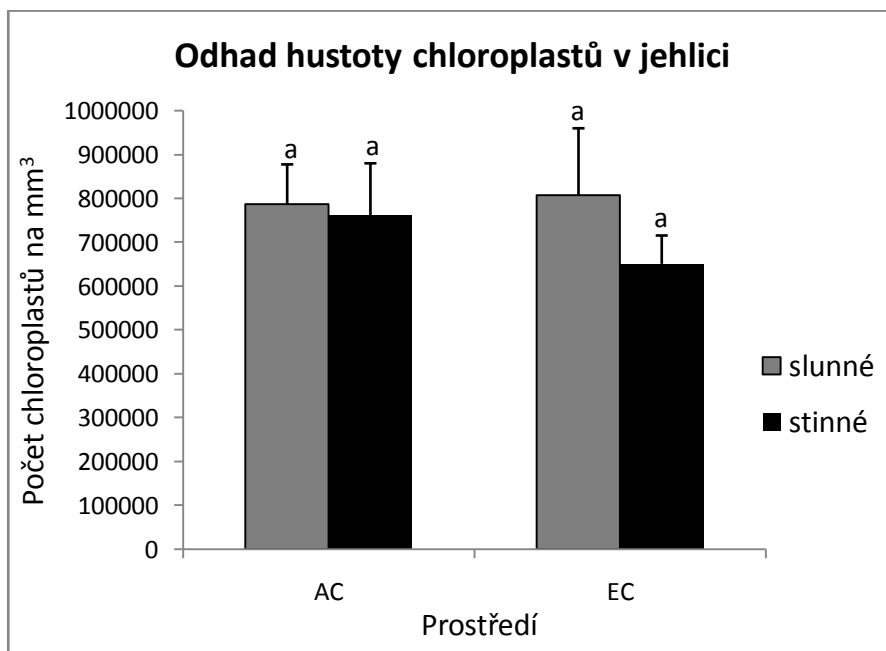
Obr. 4.5: Sloupcový graf porovnání odhadů objemu mezofylu v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady objemu mezofylu. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic ($n = 5$), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 ($n = 4$). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot mediánů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Kruskal-Wallisova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.



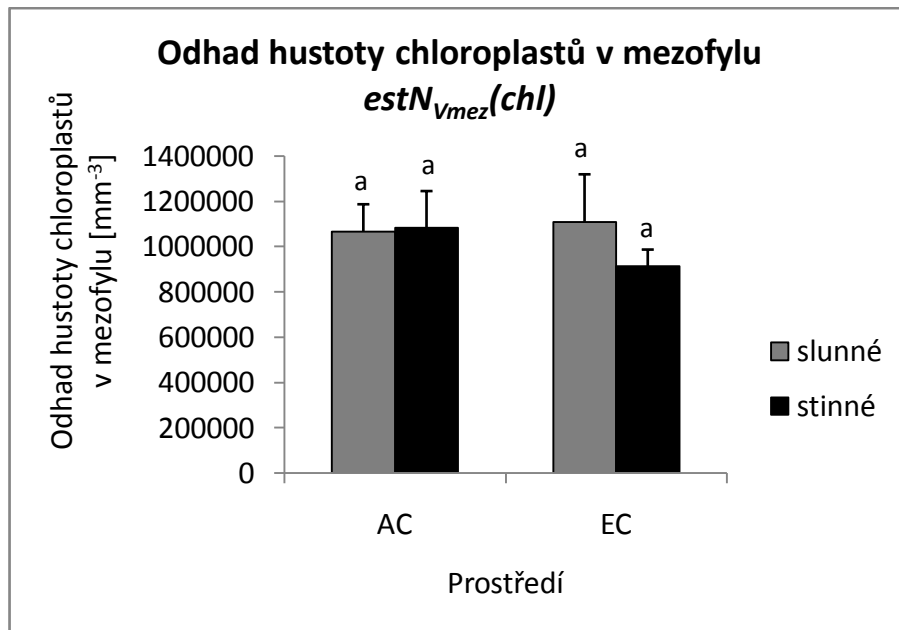
Obr. 4.6: Sloupcový graf porovnání odhadů objemového podílu mezofylu v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady objemového podílu mezofylu. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic ($n = 5$), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 ($n = 4$). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot průměrů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Tukey-Kramerova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.

Odhad hustoty chloroplastů v jehlici $estN_{Vjehi}(chl)$ neboli odhad počtu chloroplastů vztáženého na objem jehlice (obr. 4.7) ani odhad hustoty chloroplastů v mezofylu $estN_{Vmez}(chl)$ (obr. 4.8) se mezi prostředími nelišil. Stejně tak se nelišil odhad hustoty mezofylových buněk v jehlici $estN_{Vjehi}(mez.b.)$ (obr. 4.9) a odhad hustoty mezofylových buněk v mezofylu $estN_{Vmez}(mez.b.)$ (obr. 4.10). Na základě těchto údajů není překvapivé, že ani odhady průměrného počtu chloroplastů na mezofylovou buňku $estN_{Nmez.b.}(chl)$ nebyly mezi jednotlivými variantami prostředí průkazně odlišné (obr 4.11).

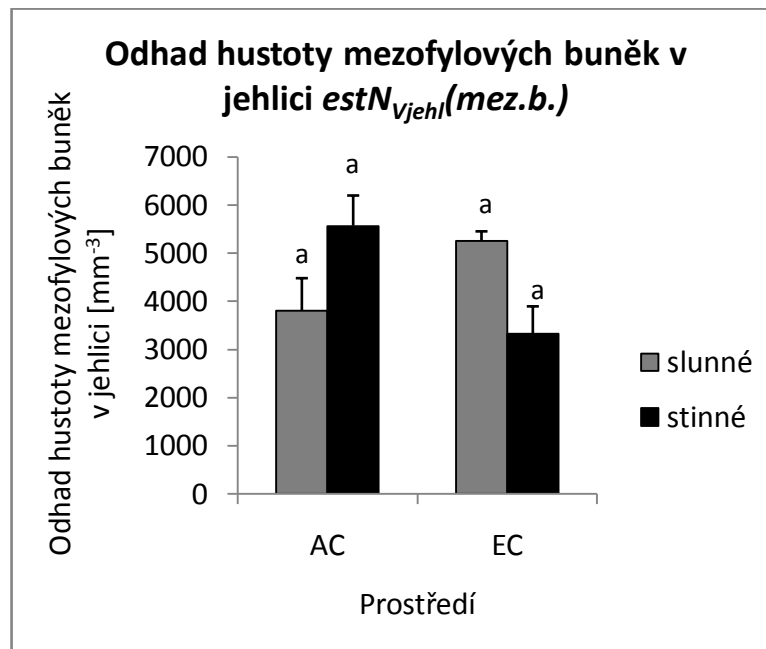
Odhad celkového počtu chloroplastů v jehlici $estN(jehl)$ byl průkazně větší u slunných jehlic v AC v porovnání se stinnými jehlicemi v obou koncentracích CO_2 (obr. 4.12).



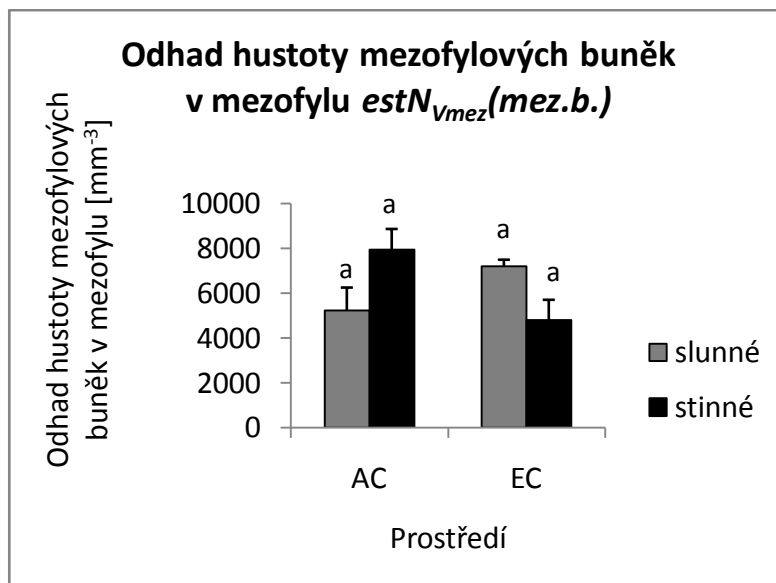
Obr. 4.7: Sloupcový graf porovnání odhadů hustoty chloroplastů v jehlici v rozdílných koncentracích CO_2 (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice $1000\text{--}1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice $300 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady hustoty chloroplastů vztážené na mm^3 objemu jehlice. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic ($n = 5$), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 ($n = 4$). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot průměrů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnáváný pomocí Tukey-Kramerova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.



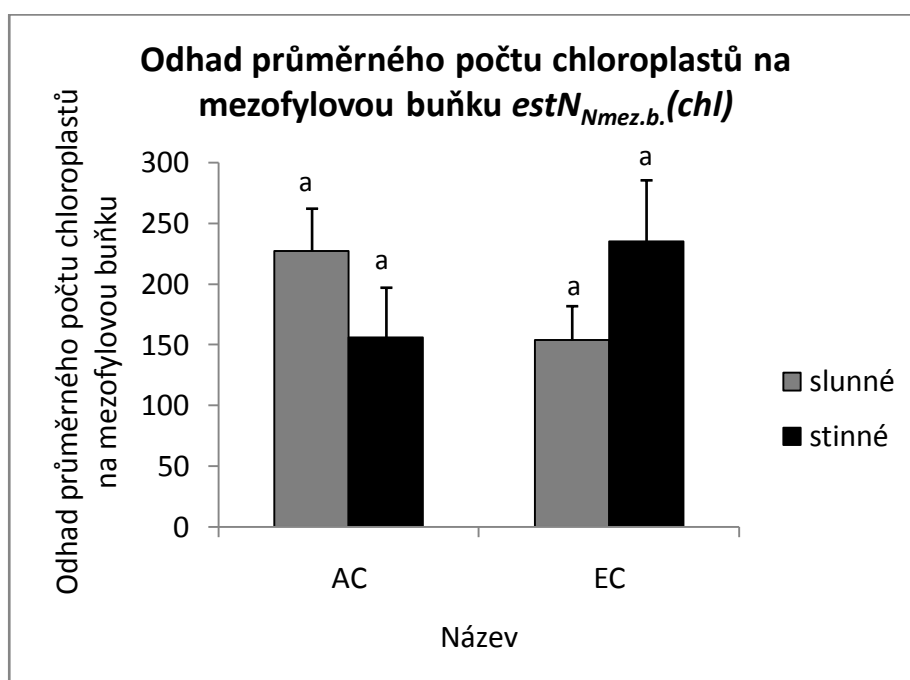
Obr. 4.8: Sloupcový graf porovnání odhadů hustoty chloroplastů v mezofylu v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady hustoty chloroplastů vztahované na mm³ objemu v mezofylu. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic (n = 5), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 (n = 4). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot průměrů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Tukey-Kramerova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti p = 0,05.



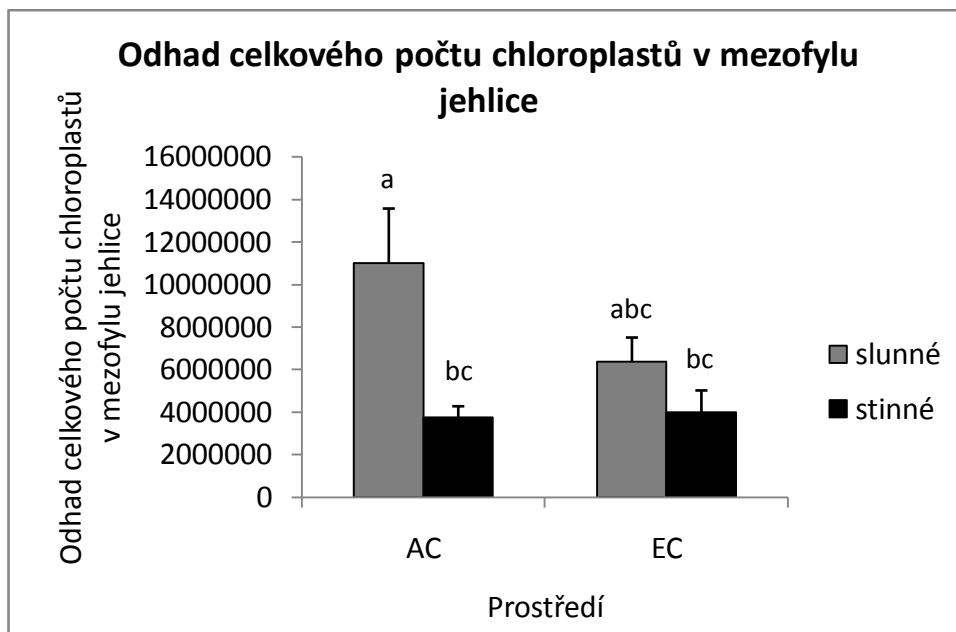
Obr. 4.9: Sloupcový graf porovnání odhadů hustoty mezofylových buněk v jehlici v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady hustoty mezofylových buněk na mm³ objemu jehlice. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic (n = 5), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 (n = 4). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot průměrů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Tukey-Kramerova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti p = 0,05.



Obr. 4.10: Sloupcový graf porovnání odhadů hustoty mezofylových buněk v mezofylu v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady hustoty mezofylových buněk na mm^3 objemu mezofylu. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic ($n = 5$), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 ($n = 4$). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot průměrů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Tukey-Kramerova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.



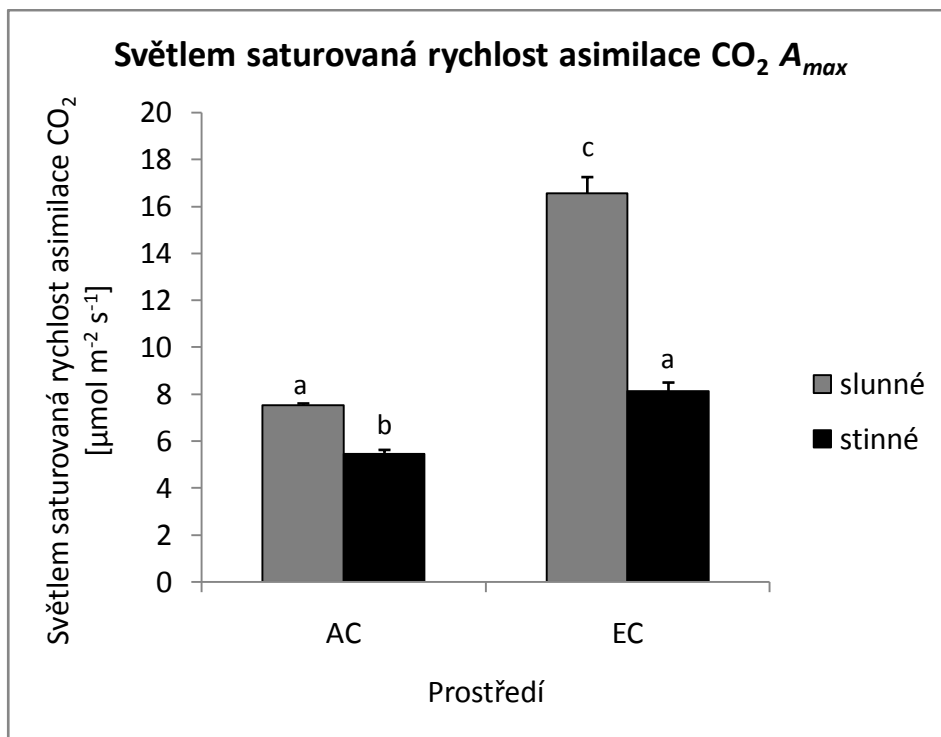
Obr. 4.11: Sloupcový graf porovnání odhadů průměrného počtu chloroplastů na mezofylovou buňku v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice 300 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady počtu chloroplastů na mezofylovou buňku. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic ($n = 5$), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 ($n = 4$). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot průměrů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Tukey-Kramerova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.



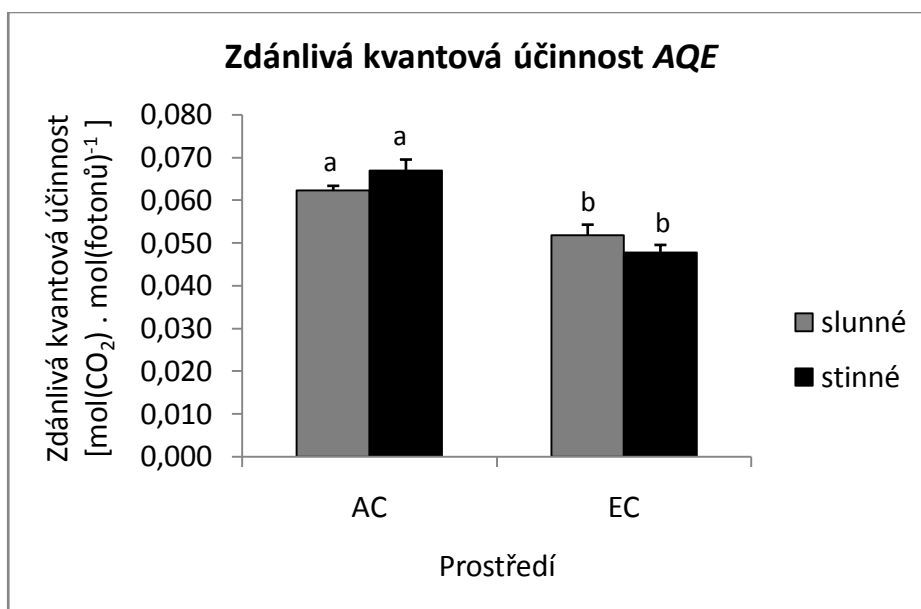
Obr. 4.12: Sloupcový graf porovnání odhadů celkového počtu chloroplastů v mezofylu jehlic v rozdílných koncentracích CO_2 (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice $1000\text{--}1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stinné jehlice $300 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné odhady celkového počtu chloroplastů v mezofylu. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 5 jehlic ($n = 5$), ve variantě slunné EC byly do výsledků zařazeny pouze 4 ($n = 4$). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot mediánů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Kruskal-Wallisova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.

4.4 Fotosyntetické charakteristiky slunných a stinných jehlic pod vlivem zvýšené koncentrace CO_2

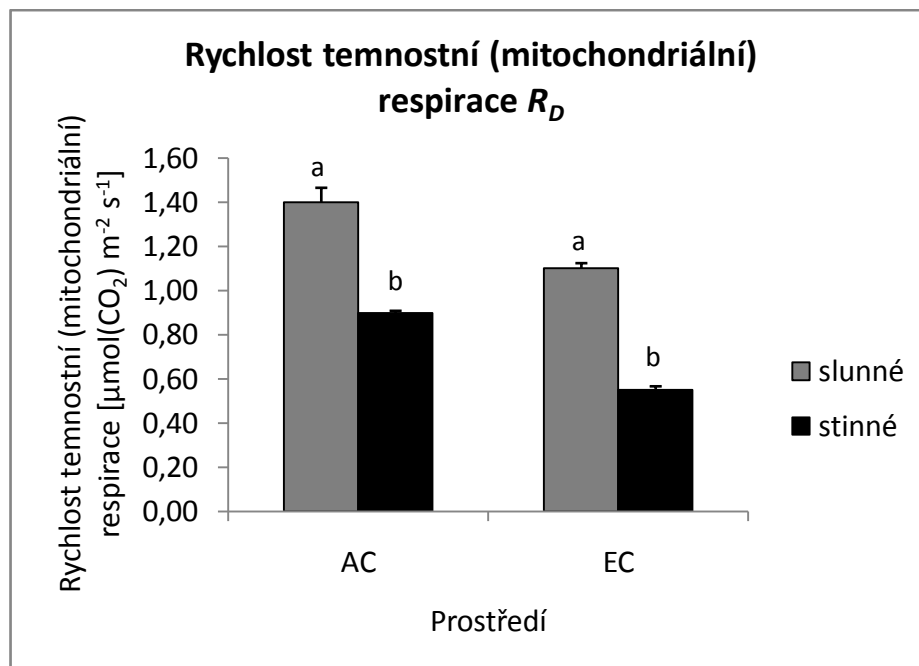
V této podkapitole uvádím výsledky, které naměřili kolegové z ÚSBE AV ČR, v.v.i. Světlem saturovaná rychlost asimilace CO_2 (A_{max}) byla průkazně nejvyšší u slunných jehlic v EC (průměr \pm SE $16,56\pm 0,69 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a nejnižší u stinných jehlic v AC (průměr \pm SE $5,45\pm 0,59 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Obr. 4.3). Zdánlivá kvantová účinnost (AQE) se mezi ozářenostmi při stejné koncentraci CO_2 nelišila a byla v AC vyšší – hodnoty se pohybovaly okolo $0,06 \text{ mol } (\text{CO}_2) \cdot \text{mol } (\text{fotonů})^{-1}$ – než v EC, kde hodnoty dosahovaly okolo $0,05 \text{ mol } (\text{CO}_2) \cdot \text{mol } (\text{fotonů})^{-1}$ (Obr. 4.4). Rychlost temnostní (mitochondriální) respirace (R_D) se zase lišila v závislosti na ozářenosti (Obr. 4.5), u slunných jehlic byla průkazně vyšší (průměr \pm SE $1,40\pm 0,07 \mu\text{mol } (\text{CO}_2) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ v AC a $1,10\pm 0,02 \mu\text{mol } (\text{CO}_2) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ v EC) než u stinných (průměr \pm SE $0,90\pm 0,01 \mu\text{mol } (\text{CO}_2) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ v AC a $0,55\pm 0,02 \mu\text{mol } (\text{CO}_2) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ v EC).



Obr. 4.3: Sloupcový graf porovnání světlem saturované rychlosti asimilace CO₂ u jehlic ze stromů pěstovaných v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 μmol fotonů m⁻² s⁻¹, stinné jehlice 300 μmol fotonů m⁻² s⁻¹) měřená při růstové koncentraci CO₂ a intenzitě světla větší než 1200 μmol fotonů m⁻² s⁻¹. V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné hodnoty. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 10 vzorků (n = 10). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot mediánů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávány pomocí Kruskal-Wallisova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti p = 0,05.



Obr. 4.4: Sloupcový graf porovnání zdánlivé kvantové účinnosti u jehlic ze stromů pěstovaných v rozdílných koncentracích CO₂ (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice 1000–1200 μmol fotonů m⁻² s⁻¹, stinné jehlice 300 μmol fotonů m⁻² s⁻¹) měřená při růstové koncentraci CO₂. V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné hodnoty. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 10 vzorků (n = 10). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot průměrů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávány pomocí Tukey-Kramerova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti p = 0,05.



Obr. 4.5: Sloupcový graf porovnání rychlosti temnostní (mitochondriální) respirace u jehlic ze stromů pěstovaných v rozdílných koncentracích CO_2 (AC – normální koncentrace, EC – zvýšená koncentrace) při rozdílných ozářenostech (slunné jehlice $1000\text{--}1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, stinné jehlice $300 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). V grafu jsou uvedeny pro každou variantu prostředí průměrné hodnoty. V každé variantě prostředí bylo proměřeno 10 vzorků ($n = 10$). Úsečky ukazují střední chybu průměru (SE, standard error of mean). Rozdíl hodnot mediánů mezi sloupci označenými shodnými písmeny porovnávaný pomocí Kruskal-Wallisova testu nebyl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.

4.5 Porovnání použití metody disektoru a jiných metod

Metoda počítání profilů chloroplastů na řezu jehlicí dává vychýlené výsledky oproti metodě disektoru (viz příklad v tabulce na obr. 4.16). Je zřejmé, že pouhé počítání profilů bez vede k vychýleným odhadům, protože částice nemají stejnou pravděpodobnost, že budou vybrány (viz obr.5.1 a 5.2).

Příklad - počty chloroplastů změřené disektorem v sériích optických řezů a počty profilů chloroplastů v prostředním řezu stejné série		
série	disektor	profily
L41_02_63x_1B	0	0
L41_02_63x_2A	60	42
L41_02_63x_2B	21	59
L41_02_63x_2C	120	91
L41_02_63x_3A	40	28
L41_02_63x_3B	0	0
L41_02_63x_3C	57	40
L41_02_63x_3D	24	24
L41_02_63x_4B	114	108

Obr. 4.6: Tabulka porovnání metody disektoru s metodou počítání profilů na řezu při počítání chloroplastů v jehlici.

5. Diskuse

5.1 Diskuse použitých metod

5.1.1 Zhodnocení dosavadních metod počítání chloroplastů

V řadě prací není uveden způsob výběru řezů a polí pro pozorování, který je nezbytný pro nevychýlený odhad anatomických parametrů, jak je popsáno v následující podkapitole. V této podkapitole jsou zhodnoceny pouze metody počítání chloroplastů, nikoli metody vzorkování.

Použitím některých v literatuře uváděných metod pro počítání chloroplastů může docházet k vychýlenému odhadu počtu chloroplastů v buňce. Metody počítání chloroplastů je možné rozdělit do několika skupin s různými předpoklady pro získání nevychýleného odhadu. Vždy třeba brát v úvahu charakteristiky pletiva, ve kterém jsou chloroplasty počítány. Proto jsou některé metody vhodné pro počítání chloroplastů v buňkách průduchů a přitom nevhodné pro počítání chloroplastů v mezofylových buňkách. Počítání chloroplastů v mezofylových buňkách lze rozdělit na počítání přímo v mikroskopu po rozmačkání buněk ze suspenze do jedné roviny, na počítání profilů chloroplastů na řezech buňkami a na počítání chloroplastů s ohledem na trojrozměrnost buňky a prostorové rozložení chloroplastů uvnitř buňky.

Použití optického mikroskopu a přímé počítání chloroplastů v buňkách průduchů se jeví jako vhodné, protože počet chloroplastů v jedné svěrací buňce není příliš vysoký – například ve svěracích buňkách haploidní papriky bylo průměrně okolo 9 chloroplastů, u diploidní okolo 18 chloroplastů, u haploidního melounu 6–7, u diploidního 11–12 a u orseje mezi 14–28 chloroplasty (Nicholson, 1981; Qin and Rotino, 1995; Sari *et al.*, 1999). Navíc lze svěrací buňky díky jejich malé velikosti v optickém mikroskopu celé prosvítit a použitím sloupnuté jednovrstevné pokožky se vyloučí možnost prosvítání chloroplastů z jiných rovin preparátu – např. z mezofylových buněk – takže zde není riziko, že by autoři došli k nesprávnému počtu chloroplastů.

Metoda počítání chloroplastů v roztlačkových preparátech (Possingham a Saurer, 1969; Cattolico, 1978; Boffey *et al.*, 1979) umožňuje nevychýlený odhad počtu chloroplastů, protože chloroplasty jsou v preparátu v jedné rovině zaostření a tudíž nehrozí, že by autoři dospěli k nesprávnému vychýlenému výsledku. Nevýhodou této metody je, že tato metoda je poměrně náročná na přípravu preparátů a není uvedeno, zda bylo docíleno náhodného výběru roztlačovaných buněk. Následkem roztlačení buněk také není možné nic usoudit o rozmístění či orientaci organel v buňce.

Další skupina metod odhadu počtu chloroplastů používá počty profilů na řezech buňkami (např. Wang *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2006). Tato metoda neumožňuje nevychýlený odhad počtu chloroplastů. Důvodem je, že při počítání profilů částic v jedné rovině mají větší částice větší pravděpodobnost, že budou vybrány danou rovinou a záleží též na poloze a rozmístění částic v prostoru. V případě počítání profilů chloroplastů navíc hraje roli jejich zploštělý tvar – záleží i na natočení chloroplastu. V jedné rovině pozorování se také může překrývat více chloroplastů. Použitím metody odhadu počtu chloroplastů z počtu profilů na řezech (Wang *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2006) mohlo dojít k vychýlenému odhadu počtu chloroplastů na buňku.

5.1.2 Princip systematicky rovnoměrně náhodného výběru

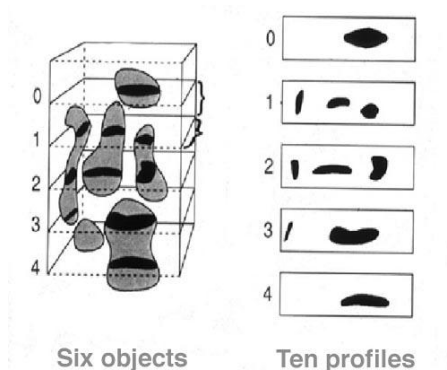
Anatomické parametry listů nemusí být shodné ve všech místech v listu (Slavík, 1963; Pazourek, 1966; Kubinová, 1989; Pyke *et al.*, 1991), a proto je třeba brát při určování odhadů anatomických charakteristik jehlic v úvahu možný gradient ve sledovaných parametrech v rámci jehlice. Ačkoli je známo, že existují gradienty v mnoha anatomických charakteristikách, většinou se pro určování anatomických parametrů používají řezy ze střední části listu nebo jehlice (Soukupová *et al.* 2000; Apple *et al.* 2002). Při zkoumání vlastností cévních svazků borovice bahenní *Pinus palustris* P. Mill. (Zwieniecki *et al.*, 2006) bylo použito více řezů z jehlice, ale nebyl dodržen princip systematicky rovnoměrně náhodného vzorkování. Systematicky rovnoměrně náhodné vzorkování bylo v literatuře použito například pro určení anatomických parametrů listu ječmene (Kubinová, 1991) a také při určování anatomických parametrů smrku ztepilého (Albrechtová *et al.*, 2007; Lhotakova *et al.*, 2007; Lhotakova *et al.*, 2008; Lhotáková *et al.* – manuskript).

Protože jsme v této práci chtěli dospět k odhadům anatomických parametrů platných pro celou jehlici, museli jsme použít nevychýlené vzorkování – systematicky rovnoměrně náhodný výběr míst řezů jehlicemi. Aby byly řezy rovnoměrně rozmístěny podél celé jehlice, zvolili jsme mezi místy řezů konstantní vzdálenost (3 mm). Rovnoměrné, ale nenáhodné určení míst pro vedení řezů by mohlo vést k vychýlenému odhadu, protože měření by se uskutečnila vždy ve stejných částech jehlice, takže získané odhady parametrů by nemusely platit pro celou jehlici. Proto bylo první místo řezu určeno náhodně (v rozmezí 0,5 až 3 mm od špičky jehlice) a od něj se potom v pravidelných intervalech odměřila místa pro další řezy. Princip systematicky rovnoměrně náhodného výběru se rovněž uplatnil při vybírání míst na řezu, kde se snímaly série optických řezů pro vyhodnocení počtu chloroplastů.

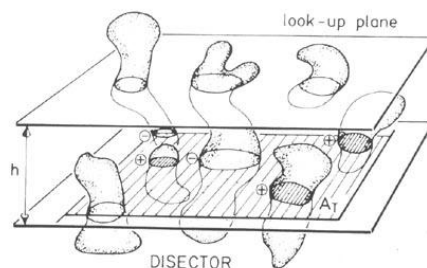
Nevychýleného počítání částic v prostoru lze docílit použitím metody disektoru (Sterio, 1984; Gundersen, 1986) (obr. 5.1 a 5.2). Pro použití metody disektoru musí být splněna podmínka, že jakýkoli průřez částicí musí být jednoznačně přiřazen ke konkrétní částici (Sterio, 1984). Tato podmínka byla v případě chloroplastů i buněk splněna.

Kromě zvolení nevychýlené metody pro určování odhadu anatomických parametrů a systematicky rovnoměrně náhodného vzorkování je při plánování pokusu také důležité správně určit počet zkoumaných listů z každé varianty a poté počet řezů a vzorkovacích polí, aby byly získané výsledky dostatečně přesné (Kubinova, 1993). V mnoha případech se ukázalo zkoumání pěti listů od každé varianty prostředí jako dostatečný počet pro získání přesného odhadu (Cruz-Orive a Weibel, 1990), proto bylo i v této studii zkoumáno pět jehlic z každé varianty prostředí. Při snímání jedné z jehlic z varianty slunné EC však došlo k chybě při snímání sérií a všechna měření provedená na těchto sériích tak neodpovídala skutečnosti; proto byly výsledky pro tuto jehlici z porovnávání vyloučeny.

Výsledky získané v této práci byly díky použitým metodám nevychýlené, ale nebyly přesné, což bylo způsobeno velkou variabilitou naměřených hodnot v rámci téže varianty prostředí. Čím větší je variabilita v rámci téže varianty, a čím menší jsou rozdíly mezi variantami, tím více listů z každé varianty je třeba odebrat (Kubinova, 1993). Pro další výzkum by bylo třeba nějak omezit výběr jehlic pro snímání tak, aby byl zkoumaný vzorek v rámci téže varianty méně variabilní – např. aby měly jehlice podobnou délku (blízkou průměrné délce pro danou variantu).



Obr.5.1: Schéma znázorňující skutečnost, že větší částice mají větší pravděpodobnost, že budou vybrány, a že také záleží na tvaru a umístění částic v prostoru. Malá částice vlevo dole nebyla vybrána žádnou rovinou, zatímco podlouhlá částice nad ní byla vybrána dokonce třemi rovinami. Převzato z Mouton (2005) <<http://www.ibro.info/Common/Docs/Images/3159/MoutonFig5.jpg>> .



Obr.5.2 Schéma znázorňující sondu disektoru, respektive náhledovou a referenční rovinu s vylučovacím okénkem. Převzato z Mouton (2005) <http://www.ibro.info/Common/Docs/Images/3159/MoutonFig_6.jpg> .

5.1.3 Výhody použité metody a časová efektivita měření

Použitá metoda počítání chloroplastů společně s použitým systematicky rovnoměrně náhodným vzorkováním poskytuje nevychýlený odhad počtu chloroplastů v jehlici a počtu mezofylových buněk v jehlici, z čehož je možné vyvodit odhad průměrného počtu chloroplastů v mezofylové buňce. Mezi výhody použití metody optického disektoru patří možnost uchovávat vzorky zmrazené a připravovat z nich těsně před snímáním dočasné preparáty, čímž se předchází možným artefaktům vlivem manipulace s preparátem a tento postup také šetří čas na přípravu preparátů, která je u mnohých metod velmi časově náročná.

Na druhou stranu bylo snímání jehlic konfokálním mikroskopem časově náročné – jehlici bylo nutno nasnímat celou najednou, protože naříznutá jehlice se nedala uchovat tak, aby byla vhodná pro pokračování ve snímání např. další den. Nasnímání jednoho řezu jehlicí trvalo okolo dvou hodin, a proto snímání jedné jehlice zabralo minimálně 9 hodin, v některých případech dokonce více než 11 hodin. Rezervace tak dlouhé nepřetržité doby u mikroskopu byla vzhledem k vytížení přístroje jeho pravidelnými uživateli v pracovním týdnu většinou obtížná. Po nasnímání několika jehlic v prosinci 2008 bylo rozhodnuto, že bude od každé varianty nasnímáno 5 jehlic, aby bylo jejich nasnímání a vyhodnocení získaných obrazových dat časově zvládnutelné. V zimě na přelomu let 2008 a 2009 byla upravena metodika a většina obrazových dat byla nasnímána v období od března do srpna 2009 z jehlic uchovávaných v hlubokomrazícím boxu.

Vyhodnocování obrazových dat také zabralo velké množství času. V modulu Disector programu *Ellipse* bylo vyhodnoceno přes 500 sérií nasnímaných pro počítání chloroplastů a téměř 200 sérií pro počítání buněk. V každé sérii pro počítání chloroplastů bylo naměřeno většinou okolo několika desítek chloroplastů. Místa snímání sérií byla vybrána náhodně, a proto někdy pole připadlo na okraj jehlice. V takových případech bylo třeba pomocí bodové metody ještě odhadnout plochu, kterou v sondě zaujímal jehlice, aby bylo možné spolehlivě určit objem sondy, ke kterému se vztahoval naměřený počet chloroplastů.

Postup použitý v této práci byl časově náročný (viz tabulka na obr. 5.3), ale použití jiných metod by postup práce patrně neuspíšilo. Z literatury známé metody navíc neumožňují nevychýlený odhad počtu chloroplastů včetně nevychýleného vzorkování. Kromě správného způsobu měření zahrnuje metoda výrobu dočasných preparátů ze zmrazených jehlic. Ty lze jednoduše vyrobit a není to nijak časově ani finančně náročné oproti přípravě trvalých preparátů pro světelný mikroskop nebo preparátů pro elektronovou mikroskopii. Při výrobě trvalého preparátu může snadněji docházet ke vzniku artefaktů, které by mohly znehodnotit výsledky měření. Vzhledem k tomu, že se jednalo o první použití metody disektoru pro nevychýlený odhad počtu chloroplastů v mezofylové buňce jehlic ze sérií nasnímaných konfokálním mikroskopem, bude třeba se pro další výzkum zamyslet nad případným zefektivněním použitých postupů.

Název činnosti	Odhad celkové doby
počáteční snímání jehlic	20 hodin
snímání 20 jehlic	180 hodin
počítání chloroplastů – série 63x	250 hodin
počítání buněk – série 20x	87 hodin
určování plochy řezů	6 hodin

Obr. 5.3: Tabulka odhadu časové náročnosti jednotlivých snímání měření. Po měření ještě následovalo vyhodnocování získaných dat.

5.2 Porovnání anatomických a fotosyntetických charakteristik jehlic

Relativní poměr objemu mezofyly k objemu jehlice nebyl průkazně odlišný, stejně tak počty buněk a počty chloroplastů na buňku – tyto charakteristiky budou pravděpodobně determinované zejména genotypem a méně závislé na okolním prostředí. Při vyhodnocování výsledků je však třeba vzít také v úvahu relativní variabilitu výsledků pro jehlice ve stejných podmínkách.

Z časových důvodů neměřeným, ale zajímavým jevem byly různé tvary jehlic na řezu, kdy slunné jehlice v EC vypadaly podobně (měly protáhlejší trepkovitý tvar) jako stinné v EC a stinné v AC a lišily se od slunných v AC, které většinou měly na řezu tvar podobný kosočtverci (obr. 4.2). Odlišný tvar řezu (měřený jako délka a šířka) jehlicemi smrku ztepilého *Picea abies* L. Karst. byl již v literatuře pozorován při různé ozářenosti, kdy u jehlic v méně uzavřeném zápoji nebo ve vyšší vrstvě koruny byla délka i šířka řezu jehlicí větší (Stenberg *et al.*, 1999; Sellin, 2000) a stinné jehlice byly na řezu zploštělé oproti skoro

kruhovitým slunným jehlicím (rev. Niinemets, 2007). Na základě takového trendu se nabízí hypotéza, že po anatomické stránce zvýšená koncentrace CO₂ utlumuje rozdíl mezi slunnými a stinnými jehlicemi, což naznačují i trendy zjištěné v dalších anatomických parametrech. Vyvození obecného závěru však komplikuje velká variabilita v parametrech vzorků z téže varianty prostředí. Odlišný tvar v rámci téže varianty by možná mohl souviset s polohou a orientací jehlice na výhonu. Na základě studie (Cescatti and Zorer, 2003), kde autoři ukázali, že stinné výhony mají jiné uspořádání jehlic než slunné, tedy že ve stinných částech porostu rostou jehlice horizontálně a ve slunných rovnoměrně okolo celého výhonu, se domnívám, že by i samotné jehlice mohly mít odlišný tvar na průřezu v závislosti na jejich poloze na výhonu. Vzorky pro tuto studii v této diplomové práci byly odebrány náhodně, bez preferenční prostorové orientace vzhledem ke zdroji světla, a proto z nich nelze určit, v jaké poloze se jehlice na výhonu nacházela. Proto není z těchto vzorků možné zjistit, zda se jehlice liší tvarem na řezu v závislosti na umístění na výhonu a v závislosti na světelných a dalších podmínkách.

Možným zdůvodněním většího objemu slunných jehlic v AC než v EC by mohlo být to, že jehlice ve zvýšené koncentraci CO₂ nepotřebují být o tolik objemnější, aby čerpaly víc CO₂ když se jim naskýtá větší dostupnost světla. V tlustším listu je totiž víc chloroplastů a větší „tah“ po spádu gradientu koncentrace CO₂, protože více chloroplastů do sebe „vsává“ CO₂ (Terashima *et al.*, 2006). Relativní počet chloroplastů vztahovaný na objem mezofylu ani objemový podíl mezofylu sice nebyl odlišný mezi variantami, ale odhad celkového objemu jehlice a tedy i celkového objemu mezofylu byl větší u slunných jehlic v AC než u stinných v AC, zatímco mezi ozářenostmi v EC se nelišil. Absolutní počet chloroplastů v mezofylu ve slunných jehlicích v AC tak byl vyšší než ve stinných. Proto se domnívám, že by výše uvedená domněnka o přítomnosti většího počtu chloroplastů pro čerpání CO₂ ve slunných jehlicích v AC mohla být pravdivá. Větší absolutní počet chloroplastů by mohl být příčinou vyšší světlem saturované rychlosti asimilace CO₂ (A_{max}) u slunných než u stinných jehlic v AC. Tento parametr byl však nejvyšší u slunných jehlic v EC, poté následují stinné v EC spolu se slunnými v AC a světlem saturovaná rychlost asimilace je nejnižší ve stinných jehlicích v AC. Tyto údaje souhlasí s literaturou, kde se uvádí, že vlivem zvýšené [CO₂] se zvyšuje světlem saturovaná rychlost asimilace CO₂ (rev. Leakey *et al.*, 2009).

Hodnota světlem saturované rychlosti asimilace CO₂ (A_{max}) nesouvisí jen s absolutním počtem chloroplastů, který byl na rozdíl od A_{max} nejvyšší u slunných jehlic v AC. Změny ve fotosyntetických parametrech nemusejí záležet pouze na počtu chloroplastů, protože vlivem EC také může docházet ke změnám ultrastruktury chloroplastů, která ovlivňuje procesy uvnitř

chloroplastu. V jehlicích *Pinus palustris* P. Mill., odebraných po 20 měsících v EC (Pritchard *et al.*, 1997), a v listech dřevin *Acer rubrum* L., *Liquidambar styraciflua* L. a *Cercis canadensis* L. a bylin *Piper auritum* Kunth (Griffin *et al.*, 2001) a *Arabidopsis thaliana* L. (Teng *et al.*, 2006) byl při EC v chloroplastech pozorován větší poměr agranálních (stromatálních) thylakoidních membrán ke granálním. Protože stromatální tylakoidy obsahují zejména fotosystém I, kde je redukován NADPH a granální tylakoidy obsahují zejména fotosystém II a kyslík uvolňující komplex, dochází nárůstem podílu stromatálních tylakoidů ke granálním k přizpůsobení se rostliny na EC, protože toto uspořádání vede k účinnější fixaci CO₂ a tvorbě cukerných produktů (Griffin *et al.*, 2001). Tomu by mohlo odpovídat i to, že při EC byla naměřena větší světlem saturovaná rychlost asimilace CO₂ (A_{max}). Světlem saturovaná rychlost čisté fotosyntetické asimilace CO₂ u *Pinus taeda* byla v červenci o 50 % vyšší u tohoročních jehlic a o 24 % vyšší u ročních jehlic v EC než v AC, v EC tedy došlo ke snížení fotosyntetické aktivity (Logan *et al.*, 2009).

Se změnami v ultrastruktuře chloroplastů také bývá dávána do souvislosti aklimační deprese, což je zpomalení denní asimilace uhlíku při zvýšené koncentraci CO₂. Vlivem nárůstu obsahu škrobových zrn v chloroplastech může patrně docházet k narušení jejich ultrastruktury a tím i k narušení jejich funkce (Pritchard *et al.*, 1997; Teng *et al.*, 2006).

Rychlost čisté asimilace CO₂ obecně závisí na rychlosti karboxylace a oxygenace enzymu Rubisco a na mitochondriální respiraci. Z výsledků vyplývá, že A_{max} nebyla ovlivněna rychlostí R_D (vyšší hodnoty R_D i A_{max} se vyskytovaly shodně u slunných jehlic), proto byla patrně ovlivněna obsahem nebo vlastnostmi enzymu Rubisco. Celková in vitro aktivita enzymu Rubisco byla u jehlic smrku ztepilého (na stejném stanovišti, z něž pocházejí i vzorky použité v této práci) v AC nižší než v EC (Hrstka *et al.*, 2005), což by odpovídalo větší A_{max} v EC. Také údaje o aktivitě enzymu Rubisco v AC odpovídají tomu, že A_{max} byla u slunných jehlic vyšší – aktivita enzymu Rubisco ve slunných jehlicích ze 3. přeslenu byla vyšší v porovnání se stinnými jehlicemi v 6. přeslenu, tj. ve stejných místech odkud byly odebrány jehlice také pro tuto práci (Hrstka *et al.*, 2005). V průběhu vegetační sezóny aktivita enzymu Rubisco poklesla v AC i v EC, což nesouviselo s obsahem N v listu (Hrstka *et al.*, 2005). Pokles obsahu velké podjednotky enzymu Rubisco byl zaznamenán i u *Citrus aurantium* při 14-letém vystavení EC, kdy bylo pozorováno snížení fotosyntetické aktivity při EC, ke kterému došlo i přesto, že nenastala limitace dusíkem (Adam *et al.*, 2004).

Ohledně dlouhodobého vlivu EC na rychlost respirace se v literatuře uvádějí rozporuplné údaje – byl zaznamenán nárůst i pokles rychlosti dýchání v EC, zatímco při krátkodobém ovlivnění rychlost respirace klesá (rev. Nátr, 2000, rev. (Leakey *et al.*, 2009).

V této studii nenastaly mezi koncentracemi CO₂ průkazné rozdíly v rychlosti temnostní (mitochondriální) respirace (R_D), i když zde byl neprůkazný trend k poklesu v EC. Rychlost respirace byla průkazně vyšší u slunných jehlic než u stinných. Při dýchání se vytváří ATP a redukční ekvivalenty, které jsou potřeba při fixaci CO₂ v Calvinově cyklu, a proto by snížení rychlosti respirace u stinných jehlic mohlo částečně vysvětlovat nižší hodnoty světlem saturované rychlosti asimilace u stinných jehlic, protože by v nich vlivem menší rychlosti dýchání mohla nastat menší dostupnost ATP a redukčních ekvivalentů potřebných pro fixaci CO₂. Této domněnce však odporuje fakt, že světlem saturovaná rychlost asimilace CO₂ je větší v EC než v AC na rozdíl od sice neprůkazného, ale opačného trendu pro rychlost respirace.

Rychlost respirace by také mohla souviset s počtem mitochondrií. Ten zkoumali (Griffin *et al.*, 2001), kteří uvádějí, že u několika druhů rostlin (včetně borovice kadidlové) v EC vzrostl počet mitochondrií – tento údaj je v rozporu s domněnkou, že by rychlost respirace mohla mít trend v EC klesat z důvodu poklesu počtu mitochondrií v EC.

Respirace může hrát roli při adaptaci rostlin na zvýšenou koncentraci CO₂ a může přispět k nárůstu poměru fotosyntézy ku dýchání a tím k získání kladné bilance C u rostlin (Gonzales-Meler *et al.*, 2009). Autoři studií literatury a následnými pokusy zjistili, že změny v respiraci u různých forem rostlin a vlivem různých koncentrací CO₂ mohou být vysvětleny rozdílnými požadavky rostlin na energii pro udržování biomasy a souvisí s přítomností alternativní cesty, která spotřebovává fotosyntát bez efektivní produkce chemické energie ve formě ATP (Gonzales-Meler *et al.*, 2009).

Zdánlivá kvantová účinnost (AQE) se mezi ozářenostmi při stejné koncentraci CO₂ nelišila a byla v AC průkazně vyšší než v EC. Protože se AQE vypočítá jako směrnice počáteční lineární fáze světelné křivky fotosyntézy (při ozářenostech 0–250 μmol(fotonů) · m⁻² · s⁻¹), znamená to, že rychlost fixace CO₂ stoupá se vzrůstající ozářeností v AC strměji než v EC. Maximální světlem saturovaná rychlost asimilace CO₂ (A_{max}) je však vyšší v EC. V EC je tedy při rostoucí ozářenosti pomalejší nárůst rychlosti fixace CO₂, ale při vysoké ozářenosti nakonec dosahuje vyšších hodnot než v AC. Tomu odpovídá i údaj z literatury, že se v EC může světelný kompenzační bod (tj. hodnota ozářenosti, při které jsou procesy příjmu a výdeje CO₂ v rovnováze) posunout na nižší hladinu ozářenosti a tím dovolí rostlinám růst ve větším stínu (rev. Korner, 2006).

5.3 Vyhodnocení pravdivosti hypotéz

Hypotéza č. 1, že se vybrané anatomické parametry budou lišit mezi slunnými a stinnými jehlicemi při AC, a že u slunných jehlic oproti stinným bude větší objemový podíl mezofylu vzhledem k celkovému objemu jehlice, větší počet chloroplastů na buňku a větší hustota chloroplastů i buněk, se částečně potvrdila. Nastaly rozdíly v některých anatomických charakteristikách mezi slunnými a stinnými jehlicemi v normální koncentraci CO₂ – slunné jehlice v AC byly delší a objemnější. Naproti tomu v relativním objemu mezofylu ani v počtu chloroplastů na mezofylovou buňku nebyly rozdíly zjištěny.

Hypotéza č. 2, že se vybrané anatomické parametry budou lišit mezi slunnými a stinnými jehlicemi při EC, a že u slunných jehlic oproti stinným bude větší objemový podíl mezofylu, větší počet chloroplastů na buňku a větší hustota chloroplastů i buněk, se nepotvrdila. V EC nebyly rozdíly mezi slunnými a stinnými jehlicemi průkazné,

Hypotéza č. 3, že se vybrané anatomické parametry budou lišit mezi slunnými jehlicemi v AC a v EC, a že u jehlic ve zvýšené koncentraci CO₂ oproti těm v AC bude výraznější strukturální adaptace slunného listu, tj. větší objemový podíl mezofylu, větší počet chloroplastů na buňku a větší hustota chloroplastů i buněk, se nepotvrdila. Slunné jehlice v EC nebyly ve většině naměřených parametrů od stinných jehlic v EC, ale ani od slunných v AC průkazně odlišné.

Hypotéza č. 4, že se vybrané anatomické parametry budou lišit mezi stinnými jehlicemi v AC a v EC a že u jehlic v EC oproti těm v AC bude větší objemový podíl mezofylu, větší počet chloroplastů na buňku, větší hustota chloroplastů i buněk, se nepotvrdila. Mezi stinnými jehlicemi v AC a v EC nebyly zjištěny žádné průkazné rozdíly v anatomických parametrech.

Hypotéza č. 5, že u jehlic s vyšší rychlostí světlem saturované asimilace CO₂ bude zjištěn větší průměrný počet chloroplastů v buňce a celkový počet chloroplastů v mezofylu jehlici se potvrdila pouze z části. Průměrné počty chloroplastů na buňku se mezi variantami průkazně nelišily. Celkový počet chloroplastů v mezofylu slunných jehlic v AC byl vyšší než ve stinných v AC, kde byla nižší A_{max}. Nejvyšší A_{max} však byla u slunných jehlic v EC, jejichž počet chloroplastů se od stinných jehlic v téže koncentraci a od stinných jehlic v AC průkazně nelišil.

5.4 Přínos práce, začlenění výsledků do širšího kontextu, směřování dalšího výzkumu

V práci byly shrnuty dosavadní metody počítání chloroplastů a je zřejmé, že metody, které počítají chloroplasty na řezech pletivy často vedou k vychýleným odhadům, díky nesprávně provedenému výběru testovaných segmentů a pozorovacích polí, často není způsob výběru segmentů vůbec uveden a metody počítání chloroplastů bývají nejednoznačně popsány. Hlavním přínosem této práce je první použití metody disektoru pro počítání chloroplastů, vedoucí k nevychýlenému odhadu počtu chloroplastů. Tato metoda umožňuje nevychýlený odhad počtu chloroplastů na objem jehlice z preparátů nasnímaných konfokálním mikroskopem bez složité přípravy preparátů, i když vlastní nasnímání pozorovacích polí zůstává nadále časově náročné. Metoda proto nejdříve musela být upravena a otestována. Na základě údajů známých z literatury nebyla metoda disektoru pro počítání chloroplastů v kvantitativní rostlinné anatomii dosud použita.

Přestože byly pod vlivem zvýšené koncentrace CO_2 pozorovány rozdíly ve fotosyntetických parametrech, pro většinu měřených anatomických charakteristik nebyly zaznamenány průkazné rozdíly mezi variantami prostředí. Anatomické charakteristiky bohužel vykazovaly velkou variabilitu i v rámci téže varianty prostředí, nicméně větší počet jehlic a měření nebylo možné do pozorování zahrnout z časových důvodů (viz tabulka na obr. 5.3). Dosavadní výsledky naznačují, že struktura jehlic v EC nezáleží tolik na ozáření jako na ní závisí v AC.

Vzhledem k tomu, že nebyly zjištěny průkazné změny v relativním počtu chloroplastů, které by vysvětlovaly pozorované změny ve fotosyntetických parametrech, je možné předpokládat změny na ultrastrukturální úrovni. Proto je třeba se zabývat zkoumáním ultrastruktury chloroplastů, jejíž změny by mohly objasnit změny ve fotosyntetických parametrech.

Na tuto práci chci navázat ve svojí doktorské práci, ve které se chci zabývat studiem změn struktur fotosyntetického aparátu jehlic smrku ztepilého na ultrastrukturální úrovni (např. podíl granálních k stromatálním tylakoidům) pod vlivem zvýšené koncentrace CO_2 a rozdílné ozáření.

6. Souhrn

Cíle práce, tedy vypracování metodiky pro zjištění nevychýleného odhadu hustoty chloroplastů v mezofylu jehlic a její použití pro porovnání působení vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na vybrané anatomické parametry stinných a slunných jehlic smrku ztepilého a porovnání naměřených anatomických a fyziologických parametrů, byly splněny.

6.1 Metodické závěry

- Metoda disektoru je vhodná pro počítání chloroplastů v sériích optických řezů nasnímaných z ručních řezů jehlicemi smrku ztepilého v konfokálním mikroskopu bez nutnosti předchozí mikrotechnické úpravy vzorků.
- Metoda disektoru byla pro počítání chloroplastů použita poprvé – jedná se o originální metodický přístup. Metoda je unikátní tím, že při použití systematicky rovnoměrně náhodného vzorkování umožňuje nevychýlený odhad počtu chloroplastů na objem jehlice z preparátů nasnímaných konfokálním mikroskopem.

6.2 Experimentálně ekofyziologické závěry

- Délka jehlic, a tím i objem jehlic a celkový počet chloroplastů v mezofylu jehlice byly statisticky průkazně odlišné mezi slunnými jehlicemi v AC, kde byly hodnoty těchto charakteristik nejvyšší, a jehlicemi v ostatních variantách prostředí.
- V EC byly rozdíly mezi slunnými a stinnými jehlicemi menší než v AC. Dosavadní výsledky tak naznačují, že v EC nezáleží výsledná podoba struktury jehlic tolik na ozáření jako na ní závisí v AC.
- Přestože byly pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ pozorovány průkazné rozdíly ve fotosyntetických parametrech mezi různými prostředími, nebylo možné je dát do jednoznačných souvislostí s anatomickými parametry, které se od sebe většinou průkazně nelišily a navíc byly často variabilní i v rámci téže varianty prostředí.
- Pro bližší porozumění a objasnění vlivu zvýšené koncentrace CO₂ a kombinace jejího vlivu s ozářeností je třeba dále zkoumat změny probíhající na všech hierarchických úrovních pozorování. Spolupůsobení zvýšené koncentrace CO₂ a ozáření na rostliny ještě stále není dostatečně objasněno a zasluhuje si proto další výzkum.

7. Seznam citované literatury

- Adam NR, Wall GW, Kimball BA, Idso SB, Webber AN.** 2004. Photosynthetic down-regulation over long-term CO₂ enrichment in leaves of sour orange (*Citrus aurantium*) trees. *New Phytologist* **163**, 341-347.
- Ainsworth EA, Long SP.** 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy. *New Phytologist* **165**, 351-371.
- Albrechtova J, Janacek J, Lhotakova Z, Radochova B, Kubinova L.** 2007. Novel efficient methods for measuring mesophyll anatomical characteristics from fresh thick sections using stereology and confocal microscopy: application on acid rain-treated Norway spruce needles. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1451-1461.
- Anderson JM, Chow WS, Goodchild DJ.** 1988. Thylakoid membrane organisation is sun/shade acclimation. – *Aust. J. Plant Physiol.* **15**: 11-26 in **Hrstka M, Urban O, Marek MV.** 2005.
- Apple M, Tiekotter K, Snow M, Young J, Soeldner A, Phillips D, Tingey D, Bond BJ.** 2002. Needle anatomy changes with increasing tree age in Douglas-fir. *Tree Physiology* **22**, 129-136.
- Apple ME, Olszyk DM, Ormrod DP, Lewis A, Southworth D, Tingey DT.** 2000. Morphology and stomatal function of Douglas fir needles exposed to climate change: Elevated CO₂ and temperature. *International Journal of Plant Sciences* **161**, 127-132.
- Beerling DJ, Chaloner WG.** 1993. EVOLUTIONARY RESPONSES OF STOMATAL DENSITY TO GLOBAL CO₂ CHANGE. *Biological Journal of the Linnean Society* **48**, 343-353.
- Bettarini I, Vaccari F, Miglietta F.** 1998. Elevated CO₂ concentrations and stomatal density: observations from 17 plant species growing in a CO₂ spring in central Italy. *Global Change Biology* **4**, 17–22.
- Bockers M, Capkova V, Ticha I, Schafer C.** 1997. Growth at high CO₂ affects the chloroplast number but not the photosynthetic efficiency of photoautotrophic *Marchantia polymorpha* culture cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **48**, 103-110.
- Boffey SA, Ellis JR, Sellden G, Leech RM.** 1979. CHLOROPLAST DIVISION AND DNA-SYNTHESIS IN LIGHT-GROWN WHEAT LEAVES. *Plant Physiology* **64**, 502-505.
- Calfapietra C, Ainsworth EA, Beier C, De Angelis P, Ellsworth DS, Godbold DL, Hendrey GR, Hickler T, Hoosbeek MR, Karnosky DF, King J, Korner C, Leakey ADB, Lewin KF, Liberloo M, Long SP, Lukac M, Matyssek R, Miglietta F, Nagy J, Norby RJ, Oren R, Percy KE, Rogers A, Mugnozsa GS, Stitt M, Taylor G, Ceulemans R, Grp ES-FF.** 2010. Challenges in elevated CO₂ experiments on forests. *Trends in Plant Science* **15**, 5-10.
- Ceulemans R, Mousseau M.** 1994. TANSLEY REVIEW NO-71 - EFFECTS OF ELEVATED ATMOSPHERIC CO₂ ON WOODY-PLANTS. *New Phytologist* **127**, 425-446.

- Cruz-Orive LM, Weibel ER.** 1990. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *American Journal of Physiology* **258**, L148-L156.
- Cattolico RA.** 1978. VARIATION IN PLASTID NUMBER - EFFECT ON CHLOROPLAST AND NUCLEAR DEOXYRIBONUCLEIC-ACID COMPLEMENT IN UNICELLULAR ALGA OLISTHODISCUS-LUTEUS. *Plant Physiology* **62**, 558-562.
- Cescatti A, Zorer R.** 2003. Structural acclimation and radiation regime of silver fir (*Abies alba* Mill.) shoots along a light gradient. *Plant Cell and Environment* **26**, 429-442.
- Conroy J, Barlow EWR, Bevege DI.** 1986. RESPONSE OF PINUS-RADIATA SEEDLINGS TO CARBON-DIOXIDE ENRICHMENT AT DIFFERENT LEVELS OF WATER AND PHOSPHORUS - GROWTH, MORPHOLOGY AND ANATOMY. *Annals of Botany* **57**, 165-177.
- Crous KY, Walters MB, Ellsworth DS.** 2008. Elevated CO₂ concentration affects leaf photosynthesis-nitrogen relationships in *Pinus taeda* over nine years in FACE. *Tree Physiology* **28**, 607-614.
- Dean C, Leech RM.** 1982. GENOME EXPRESSION DURING NORMAL LEAF DEVELOPMENT .1. CELLULAR AND CHLOROPLAST NUMBERS AND DNA, RNA, AND PROTEIN-LEVELS IN TISSUES OF DIFFERENT AGES WITHIN A 7-DAY-OLD WHEAT LEAF. *Plant Physiology* **69**, 904-910.
- Dobisová M.** 2005. *The impact of long-term CO₂ enrichment on phenolics accumulation and anatomy of Norway spruce (Picea abies L. Karst.) needles.* Praha, 117 s. Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Školitelka diplomové práce doc. Jana Albrechtová.
- Eguchi N, Fukatsu E, Funada R, Tobita H, Kitao M, Maruyama Y, Koike T.** 2004. Changes in morphology, anatomy, and photosynthetic capacity of needles of Japanese larch (*Larix kaempferi*) seedlings grown in high CO₂ concentrations. *Photosynthetica* **42**, 173-178.
- Eguchi N, Karatsu K, Ueda T, Funada R, Takagi K, Hiura T, Sasa K, Koike T.** 2008. Photosynthetic responses of birch and alder saplings grown in a free air CO₂ enrichment system in northern Japan. *Trees-Structure and Function* **22**, 437-447.
- Ellis JR, Leech RM.** 1985. CELL-SIZE AND CHLOROPLAST SIZE IN RELATION TO CHLOROPLAST REPLICATION IN LIGHT-GROWN WHEAT LEAVES. *Planta* **165**, 120-125.
- Etheridge DM, Steele LP, Langenfelds RL, Francey RJ, Barnola J-M, Morgan VI.** 1998. *Historical CO₂ records from the Law Dome DE08, DE08-2, and DSS ice cores.* In *Trends: A Compendium of Data on Global Change* [online]. CDIAC, ORNL, June 1998. <<http://cdiac.ornl.gov/trends/co2/lawdome.html>>.
- Fendrych M.** 2005. *Kvantitativní analýza průduchů jehlic smrku ztepilého pěstovaného ve zvýšené koncentraci CO₂.* Praha, 34 s. Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Vedoucí seminární práce doc. Jana Albrechtová.
- Ferris R, Sabatti M, Miglietta F, Mills RF, Taylor G.** 2001. Leaf area is stimulated in *Populus* by free air CO₂ enrichment (POPFACE), through increased cell expansion and production. *Plant Cell and Environment* **24**, 305-315.

- Frandsen N.** 1968. Die Plastidenzahl als Merkmal bei der Kartoffel. *Theoretical and Applied Genetics* **38**, 153-167.
- Gibeaut DM, Cramer GR, Seemann JR.** 2001. Growth, cell walls, and UDP-Glc dehydrogenase activity of *Arabidopsis thaliana* grown in elevated carbon dioxide. *Journal of Plant Physiology* **158**, 569-576.
- Gopi R, Jaleel CA, Panneerselvam R.** 2008. Leaf anatomical responses of *Amorphophalluscampiculatus* to triazoles fungicides *EurAsian Journal of BioSciences* **2**, 46-52.
- Griffin KL, Anderson OR, Gastrich MD, Lewis JD, Lin GH, Schuster W, Seemann JR, Tissue DT, Turnbull MH, Whitehead D.** 2001. Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2473-2478.
- Gundersen HJG.** 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of Microscopy* **111**, 219-223.
- Gundersen HJG.** 1986. Stereology of arbitrary particles. *Journal of Microscopy* **143**, 3-45.
- Gundersen, HJG, Jensen, EB.** 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy* **147**, 229-263. (in Kubínová & Albrechtová, 1999, Charles University, *Stereology in Plant Anatomy S4G*):
- Hanba YT, Kogami H, Terashima I.** 2002. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell and Environment* **25**, 1021-1030.
- Hassan L, Wazuddin M.** 2000. Colchicine-induced variation of cell size and chloroplast number in leaf mesophyll of rice. *Plant Breeding* **119**, 531-533.
- Hattenschwiler S.** 2001. Tree seedling growth in natural deep shade: functional traits related to interspecific variation in response to elevated CO₂. *Oecologia* **129**, 31-42.
- Hrstka M, Urban O, Marek MV.** 2005. Long-term effect of elevated CO₂ on spatial differentiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in Norway spruce canopy. *Photosynthetica* **43**, 211-216.
- Hurlbert SH.** 1984. PSEUDOREPLICATION AND THE DESIGN OF ECOLOGICAL FIELD EXPERIMENTS. *Ecological Monographs* **54**, 187-211.
- Chaly N, Possingham JV, Thomson WW.** 1980. CHLOROPLAST DIVISION IN SPINACH LEAVES EXAMINED BY SCANNING ELECTRON-MICROSCOPY AND FREEZE-ETCHING. *Journal of Cell Science* **46**, 87-96.
- Tissue and Organ Culture* **41**, 145-149.
- Jach ME, Ceulemans R.** 1999. Effects of elevated atmospheric CO₂ on phenology, growth and crown structure of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings after two years of exposure in the field. *Tree Physiology* **19**, 289-300.
- Jacobs JP, Yoder JJ.** 1989. PLOIDY LEVELS IN TRANSGENIC TOMATO PLANTS DETERMINED BY CHLOROPLAST NUMBER. *Plant Cell Reports* **7**, 662-664.

- Kalina J, Urban O, Cajanek M, Kurasova I, Spunda V, Marek MV.** 2001. Different responses of Norway spruce needles from shaded and exposed crown layers to the prolonged exposure to elevated CO₂ studied by various chlorophyll a fluorescence techniques. *Photosynthetica* **39**, 369-376.
- Kariya K, Tsunoda S.** 1971. Relationship of chlorophyll content, chloroplast area index and leaf photosynthesis rate in *Brassica*. *Tohoku Journal of Agricultural Research* **23**, 1-14
- Kinsman EA, Lewis C, Davies MS, Young JE, Francis D, Vilhar B, Ougham HJ.** 1997. Elevated CO₂ stimulates cells to divide in grass meristems: a differential effect in two natural populations of *Dactylis glomerata*. *Plant Cell and Environment* **20**, 1309-1316.
- Körner C.** 2003. Atmospheric CO₂ enrichment – an ecological perspective. in **Larcher W.** 2003. *Physiological Plant Ecology*. 4th edition. Springer, pages 177-184.
- Körner C.** 2006. Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytologist* **172**, 393-411.
- Kouwenberg LLR, Kurschner WM, Visscher H.** 2004. Changes in stomatal frequency and size during elongation of *Tsuga heterophylla* needles. *Annals of Botany* **94**, 561-569.
- Kubínova L.** 1989. *EFFECT OF LIGHT-INTENSITY ON ANATOMICAL STRUCTURE OF THE LEAF BLADE OF BARLEY - STEREOLOGICAL ANALYSIS.*
- Kubínova L.** 1991. STOMATA AND MESOPHYLL CHARACTERISTICS OF BARLEY LEAF AS AFFECTED BY LIGHT - STEREOLOGICAL ANALYSIS. *Journal of Experimental Botany* **42**, 995-1001.
- Kubínova L.** 1993. RECENT STEREOLOGICAL METHODS FOR THE MEASUREMENT OF LEAF ANATOMICAL CHARACTERISTICS - ESTIMATION OF VOLUME DENSITY, VOLUME AND SURFACE-AREA. *Journal of Experimental Botany* **44**, 165-173.
- Kubínova L.** 1994. RECENT STEREOLOGICAL METHODS FOR MEASURING LEAF ANATOMICAL CHARACTERISTICS - ESTIMATION OF THE NUMBER AND SIZES OF STOMATA AND MESOPHYLL-CELLS. *Journal of Experimental Botany* **45**, 119-127.
- Kubínová L, Albrechtová J.** 1999. Charles University, *Stereology in Plant Anatomy S4G*
- Kubínová L, Janáček J, Krekule I.** 2002. Stereological Methods for Estimating Geometrical Parameters of Microscopical Structure Studied by Three-dimensional Microscopical Techniques. In *Confocal and Two-photon Microscopy*, A. Diaspro, ed. New York: Wiley-Liss.
- Lamppa GK, Elliot LV, Bendich AJ.** 1980. CHANGES IN CHLOROPLAST NUMBER DURING PEA LEAF DEVELOPMENT - AN ANALYSIS OF A PROTOPLAST POPULATION. *Planta* **148**, 437-443.
- Leadley PW, Reynolds JA, Thomas JF, Reynolds JF.** 1987. EFFECTS OF CO₂ ENRICHMENT ON INTERNAL LEAF SURFACE-AREA IN SOYBEANS. *Botanical Gazette* **148**, 137-140.

- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR.** 2009. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2859-2876.
- Lewin KF, Hendrey GR, Nagy J, Lamorte RL.** 1994. DESIGN AND APPLICATION OF A FREE-AIR CARBON-DIOXIDE ENRICHMENT FACILITY. *Agricultural and Forest Meteorology* **70**, 15-29.
- Lhotakova Z, Albrechtova J, Janacek J, Kubinova L.** 2008. Advantages and pitfalls of using free-hand sections of frozen needles for three-dimensional analysis of mesophyll by stereology and confocal microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford* **232**, 56-63.
- Lhotakova Z, Albrechtova J, Malenovsky Z, Rock BN, Polak T, Cudlin P.** 2007. Does the azimuth orientation of Norway spruce (*Picea abies*/L./Karst.) branches within sunlit crown part influence the heterogeneity of biochemical, structural and spectral characteristics of needles? *Environmental and Experimental Botany* **59**, 283-292.
- Lhotáková Z, Otmar U, Dubánková M, Cvikrová M, Tomášková I, Kubínová L, Zvára K, Marek MV, Albrechtová J.** (manuskript). The impact of long-term CO₂ enrichment on sun and shade needles of Norway spruce (*Picea abies*): photosynthetic performance, needle anatomy and phenolic compounds
- Lin JX, Jach ME, Ceulemans R.** 2001. Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO₂. *New Phytologist* **150**, 665-674.
- Logan BA, Combs A, Myers K, Kent R, Stanley L, Tissue DT.** 2009. Seasonal response of photosynthetic electron transport and energy dissipation in the eighth year of exposure to elevated atmospheric CO₂ (FACE) in *Pinus taeda* (loblolly pine). *Tree Physiology* **29**, 789-797.
- Luomala EM, Laitinen K, Sutinen S, Kellomaki S, Vapaavuori E.** 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant Cell and Environment* **28**, 733-749.
- Maier CA, Palmroth S, Ward E.** 2008. Short-term effects of fertilization on photosynthesis and leaf morphology of field-grown loblolly pine following long-term exposure to elevated CO₂ concentration. *Tree Physiology* **28**, 597-606.
- Marek MV, Urban O, Sprtova M, Pokorny R, Rosova Z, Kulhavy J.** 2002. Photosynthetic assimilation of sun versus shade Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst needles under the long-term impact of elevated CO₂ concentration. *Photosynthetica* **40**, 259-267.
- Marrison JL, Rutherford SM, Robertson EJ, Lister C, Dean C, Leech RM.** 1999. The distinctive roles of five different ARC genes in the chloroplast division process in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **18**, 651-662.
- Meyer R, Yuan J, Afzal J, Iqbal MJ, Zhu MX, Garvey G, Lightfoot DA.** 2006. Identification of Gsr1 in *Arabidopsis thaliana*: A locus inferred to regulate gene expression in response to exogenous glutamine. *Euphytica* **151**, 291-302.
- Michel RP, Cruzorive LM.** 1988. APPLICATION OF THE CAVALIERI PRINCIPLE AND VERTICAL SECTIONS METHOD TO LUNG - ESTIMATION OF VOLUME AND PLEURAL SURFACE-AREA. *Journal of Microscopy-Oxford* **150**, 117-136.

- Mochizuki A, Sueoka N.** 1955. Genetic studies on the number of plastid in stomata. I. Effect of autopolyploidy in sugar beets. *Cytologia* **20**, 358-366.
- Molin WT, Meyers SP, Baer GR, Schrader LE.** 1982. PLOIDY EFFECTS IN ISOGENIC POPULATIONS OF ALFALFA .2. PHOTOSYNTHESIS, CHLOROPLAST NUMBER, RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE, CHLOROPHYLL, AND DNA IN PROTOPLASTS. *Plant Physiology* **70**, 1710-1714.
- Mouton PR.** 2005. History of Modern Stereology, *IBRO History of Neuroscience*. WWW: <http://www.ibro.info/Pub/Pub_Main_Display.asp?LC_Docs_ID=3159>.
- Nátr L.** 2000. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. ISV nakladatelství, Praha, 257 s. ISBN 80-85866-62-5.
- Nicholson GG.** 1981. THE USE OF CHLOROPLAST NUMBERS IN GUARD-CELLS AS A MEANS OF DISTINGUISHING THE CHROMOSOME RACES OF RANUNCULUS-FICARIA L. *Annals of Botany* **48**, 909-913.
- Niinemets U.** 2007. Photosynthesis and resource distribution through plant canopies. *Plant Cell and Environment* **30**, 1052-1071.
- Niinemets U, Lukjanova A, Turnbull MH, Sparrow AD.** 2007. Plasticity in mesophyll volume fraction modulates light-acclimation in needle photosynthesis in two pines. *Tree Physiology* **27**, 1137-1151.
- Nowak RS, Ellsworth DS, Smith SD.** 2004. Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂ - do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytologist* **162**, 253-280.
- Oguchi R, Hikosaka K, Hiura T, Hirose T.** 2008. Costs and benefits of photosynthetic light acclimation by tree seedlings in response to gap formation. *Oecologia* **155**, 665-675.
- Oksanen E, Riikonen J, Kaakinen S, Holopainen T, Vapaavuori E.** 2005. Structural characteristics and chemical composition of birch (*Betula pendula*) leaves are modified by increasing CO₂ and ozone. *Global Change Biology* **11**, 732-748.
- Oksanen E, Sober J, Karnosky DF.** 2001. Impacts of elevated CO₂ and/or O₃ on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the Aspen FACE experiment. *Environmental Pollution* **115**, 437-446.
- Olszyk D, Apple M, Gartner B, Spicer R, Wise C, Buckner E, Benson-Scott A, Tingey D.** 2005. Xeromorphy increases in shoots of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco seedlings with exposure to elevated temperature but not elevated CO₂. *Trees-Structure and Function* **19**, 552-563.
- Onoda Y, Hirose T, Hikosaka K.** 2007. Effect of elevated CO₂ levels on leaf starch, nitrogen and photosynthesis of plants growing at three natural CO₂ springs in Japan. *Ecological Research* **22**, 475-484.
- Pazourek J.** 1966. Anatomical gradients. *Ada Universitatis Carolinae—Biologica*, Suppl. **1/2**, 19-25
- Pehu E, Veilleux RE, Hilu KW.** 1987. CLUSTER-ANALYSIS OF ANTHOR-DERIVED PLANTS OF SOLANUM PHUREJA (SOLANACEAE) BASED ON MORPHOLOGICAL-CHARACTERISTICS. *American Journal of Botany* **74**, 47-52.

- Pokorny R, Tomaskova I, Marek MV.** (in press) Effect of elevated atmospheric [CO₂] on Norway spruce needle parameters
- Pospisilova J, Catsky J.** 1999. Development of water stress under increased atmospheric CO₂ concentration. *Biologia Plantarum* **42**, 1-24.
- Possingh.Jv, Saurer W.** 1969. CHANGES IN CHLOROPLAST NUMBER PER CELL DURING LEAF DEVELOPMENT IN SPINACH. *Planta* **86**, 186-&.
- Possingh.Jv, Smith JW.** 1972. FACTORS AFFECTING CHLOROPLAST REPLICATION IN SPINACH. *Journal of Experimental Botany* **23**, 1050-&.
- Pritchard SG, Mosjidis C, Peterson CM, Runion GB, Rogers HH.** 1998. Anatomical and morphological alterations in longleaf pine needles resulting from growth in elevated CO₂: Interactions with soil resource availability. *International Journal of Plant Sciences* **159**, 1002-1009.
- Pritchard SG, Peterson CM, Prior SA, Rogers HH.** 1997. Elevated atmospheric CO₂ differentially affects needle chloroplast ultrastructure and phloem anatomy in *Pinus palustris*: Interactions with soil resource availability. *Plant Cell and Environment* **20**, 461-471.
- Pritchard SG, Rogers HH, Prior SA, Peterson CM.** 1999. Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Global Change Biology* **5**, 807-837.
- Priwitzer T, Urban O, Sprtova M, Marek MV.** 1998. Chloroplastic carbon dioxide concentration in Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) needles relates to the position within the crown. *Photosynthetica* **35**, 561-571.
- Pyke KA, Leech RM.** 1991. RAPID IMAGE-ANALYSIS SCREENING-PROCEDURE FOR IDENTIFYING CHLOROPLAST NUMBER MUTANTS IN MESOPHYLL-CELLS OF ARABIDOPSIS-THALIANA (L) HEYNH. *Plant Physiology* **96**, 1193-1195.
- Pyke KA, Leech RM.** 1992. CHLOROPLAST DIVISION AND EXPANSION IS RADICALLY ALTERED BY NUCLEAR MUTATIONS IN ARABIDOPSIS-THALIANA. *Plant Physiology* **99**, 1005-1008.
- Pyke KA, Marrison JL, Leech RM.** 1991. TEMPORAL AND SPATIAL DEVELOPMENT OF THE CELLS OF THE EXPANDING 1ST LEAF OF ARABIDOPSIS-THALIANA (L) HEYNH. *Journal of Experimental Botany* **42**, 1407-1416.
- Qin X, Rotino GL.** 1995. CHLOROPLAST NUMBER IN GUARD-CELLS AS PLOIDY INDICATOR OF IN VITRO-GROWN ANDROGENIC PEPPER PLANTLETS. *Plant Cell*
- Ranasinghe S, Taylor G.** 1996. Mechanism for increased leaf growth in elevated CO₂. *Journal of Experimental Botany* **47**, 349-358.
- Sam O, Ramirez C, Coronado MJ, Testillano PS, Risueno MC.** 2003. Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: leaf organization and cell ultrastructure. *Biologia Plantarum* **47**, 361-366.
- Sari N, Abak K, Pitrat M.** 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. *Scientia Horticulturae* **82**, 265-277.

- Sellin A.** 2000. Estimating the needle area from geometric measurements: application of different calculation methods to Norway spruce. *Trees-Structure and Function* **14**, 215-222.
- Sholtis JD, Gunderson CA, Norby RJ, Tissue DT.** 2004. Persistent stimulation of photosynthesis by elevated CO₂ in a sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) forest stand. *New Phytologist* **162**, 343-354.
- Slavik B.** 1963. DISTRIBUTION PATTERN OF TRANSPIRATION RATE, WATER SATURATION DEFICIT, STOMATA NUMBER AND SIZE, PHOTOSYNTHETIC AND RESPIRATION RATE IN AREA OF TOBACCO LEAF BLADE. *Biologia Plantarum* **5**, 143-&.
- Stenberg P, Kangas T, Smolander H, Linder S.** 1999. Shoot structure, canopy openness, and light interception in Norway spruce. *Plant Cell and Environment* **22**, 1133-1142.
- Sterio DC.** 1984. THE UNBIASED ESTIMATION OF NUMBER AND SIZES OF ARBITRARY PARTICLES USING THE DISSECTOR. *Journal of Microscopy-Oxford* **134**, 127-136.
- Stettler M, Eicke S, Mettler T, Messerli G, Hortensteiner S, Zeeman SC.** 2009. Blocking the Metabolism of Starch Breakdown Products in Arabidopsis Leaves Triggers Chloroplast Degradation. *Molecular Plant* **2**, 1233-1246.
- Smith AM, Stitt M.** 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell and Environment* **30**, 1126-1149.
- Soukupová J, Cvikrova M, Albrechtová J, Rock BN, Eder J.** 2000. Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *New Phytologist* **146**, 403-414.
- Sprtova M, Marek MV.** 1999. Response of photosynthesis to radiation and intercellular CO₂ concentration in sun and shade shoots of Norway spruce. *Photosynthetica* **37**, 433-445.
- Spunda V, Cajanek M, Kalina J, Lachetova I, Sprtova M, Marek MV.** 1998. Mechanistic differences in utilization of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of Norway spruce induced by the vertical distribution of photosynthetically active radiation through the tree crown. *Plant Science* **133**, 155-165.
- Tans P.** *Trends in Carbon Dioxide* [online]. NOAA/ESRL, August 2010. WWW: <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>>.
- Taylor G, Tricker PJ, Zhang FZ, Alston VJ, Miglietta F, Kuzminsky E.** 2003. Spatial and temporal effects of free-air CO₂ enrichment (POPFACE) on leaf growth, cell expansion, and cell production in a closed canopy of poplar. *Plant Physiology* **131**, 177-185.
- Teng NJ, Wang J, Chen T, Wu XQ, Wang YH, Lin JX.** 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **172**, 92-103.
- Terashima I, Hanba YT, Tazoe Y, Vyas P, Yano S.** 2006. Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* **57**, 343-354.

Tissue DT, Thomas RB, Strain BR. 1996. Growth and photosynthesis of loblolly pine (*Pinus taeda*) after exposure to elevated CO₂ for 19 months in the field. *Tree Physiology* **16**, 49-59.

Tricker PJ, Calfapietra C, Kuzminsky E, Puleggi R, Ferris R, Nathoo M, Pleasants LJ, Alston V, de Angelis P, Taylor G. 2004. Long-term acclimation of leaf production, development, longevity and quality following 3 yr exposure to free-air CO₂ enrichment during canopy closure in *Populus*. *New Phytologist* **162**, 413-426.

Thomas JF, Harvey CN. 1983. LEAF ANATOMY OF 4 SPECIES GROWN UNDER CONTINUOUS CO₂ ENRICHMENT. *Botanical Gazette* **144**, 303-309.

Thomas SC, Bazzaz FA. 1996. Elevated CO₂ and leaf shape: Are dandelions getting toothier? *American Journal of Botany* **83**, 106-111.

Tymms MJ, Scott NS, Possingham JV. 1983. DNA CONTENT OF BETA-VULGARIS CHLOROPLASTS DURING LEAF CELL EXPANSION. *Plant Physiology* **71**, 785-788.

Urban O, Janous D, Pokorny R, Markova I, Pavelka M, Fojtik Z, Sprtova M, Kalina J, Marek MV. 2001. Glass domes with adjustable windows: A novel technique for exposing juvenile forest stands to elevated CO₂ concentration. *Photosynthetica* **39**, 395-401.

Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem, Ministerstvo zemědělství ČR. *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2008.* <<http://www.uhul.cz/zelenazprava/2008/zz2008.pdf>>.

Wardley TM, Bhalla PL, Dalling MJ. 1984. 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 Physiology* **75**, 421-424.

Warner DA, Ku MSB, Edwards GE. 1987. PHOTOSYNTHESIS, LEAF ANATOMY, AND CELLULAR-CONSTITUENTS IN THE POLYPLOID C-4 GRASS PANICUM-VIRGATUM. *Plant Physiology* **84**, 461-466.

Weibel ER. 1979. *Stereological methods*, Vol. 1 Practical methods for biological morphometry. Academic press. in **Kubínová L a Albrechtová J,** 1999. Charles Univesity, *Stereology in Plant Anatomy S4G*).

West MJ, Gundersen HJG. 1990. UNBIASED STEREOLOGICAL ESTIMATION OF THE NUMBER OF NEURONS IN THE HUMAN HIPPOCAMPUS. *Journal of Comparative Neurology* **296**, 1-22.

Yamasaki T, Kudoh T, Kamimura Y, Katoh S. 1996. A vertical gradient of the chloroplast abundance among leaves of *Chenopodium album*. *Plant and Cell Physiology* **37**, 43-48.

Youngblood A, Ferguson DE. 2003. Changes in needle morphology of shade-tolerant seedlings after partial overstory canopy removal. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* **33**, 1315-1322.

Yudanova SS, Maletskaya EI, Maletskii SI. 2002. Variability of chloroplast number in populations of stomata guard cells in sugar beet *Beta vulgaris* L. *Russian Journal of Genetics* **38**, 58-63.