

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Katedra experimentální biologie rostlin



Bc. Anna Vrbová

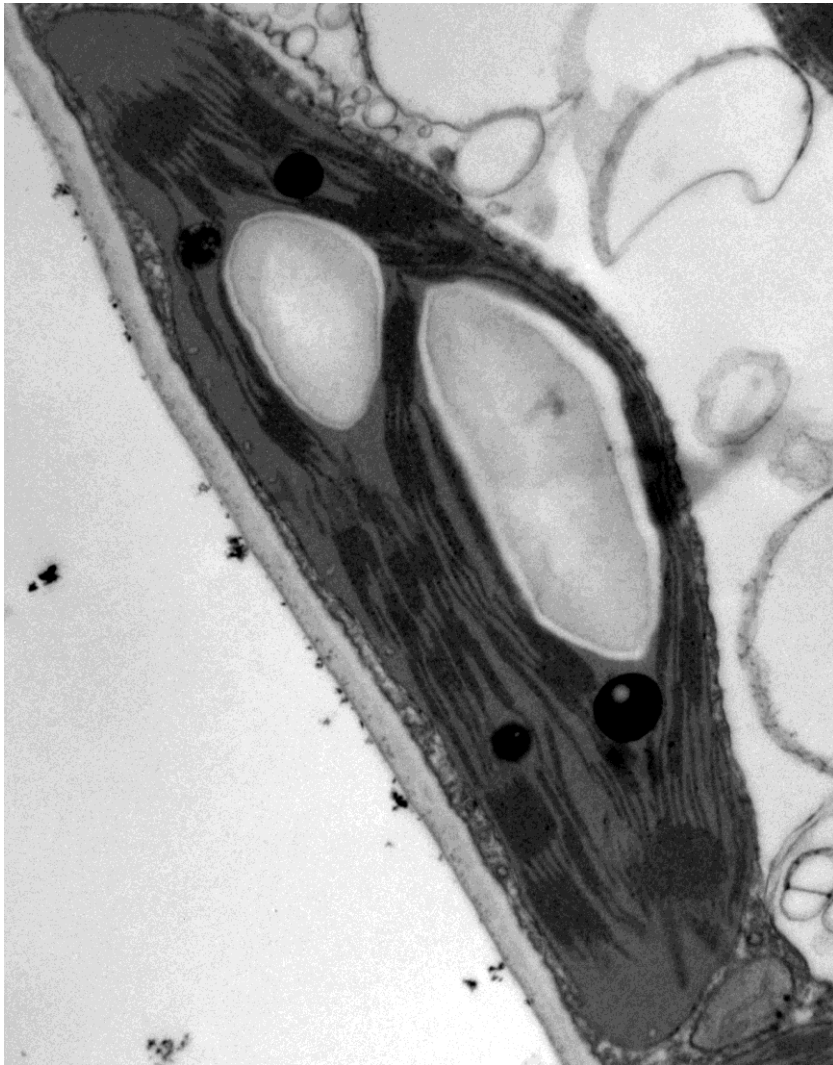
**Ultrastruktura chloroplastů
buku pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ a různé
ozáření**

Ultrastructure of beech chloroplasts
under the elevated CO₂ concentration and different irradiation

Diplomová práce

Školitelka: Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Dr.

Praha, 2014



Školitelka diplomové práce:

Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Dr., Katedra experimentální biologie rostlin PŘF UK

Konzultantky diplomové práce:

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

RNDr. Barbora Radochová, Ph.D., Oddělení biomatematiky, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Prof. RNDr. Jany Albrechtové, Dr. a za konzultace Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D. a RNDr. Barbory Radochové, Ph.D. a souhlasím s jejím zveřejňováním.

V Praze, dne

Anna Vrbová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní profesorce Janě Albrechtové a doktorkám Zuzaně Lhotákové a Barboře Radochové za vstřícnost a trpělivost při vedení této práce a cenné rady a připomínky při jejím sepisování.

Děkuji doktorce Mirce Šprtové, doktoru Otmaru Urbanovi a dalším pracovníkům Laboratoře ekologické fyziologie rostlin Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i. za možnost odběru vzorků z jejich experimentálního stanoviště.

Můj dík také patří docentovi Ondřeji Prášilovi z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Třeboni za přínosnou konzultaci mé práce.

Dále děkuji doktorkám Daně Holé a Marii Kočové za pomoc při odběrech vzorků.

Práce byla vypracována v rámci projektu GA ČR č. P501/10/0340 s názvem „Vliv zvýšené koncentrace CO₂ a ozářenosti na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních“,
Algatech, CZ.1.05/2.1.00/03.0110

ABSTRAKT

Lesní porosty mohou fungovat jako významná úložiště, sinky uhlíku, díky jeho ukládání do rostlinné biomasy v procesu fotosyntézy a do půdy. Zvýšení koncentrace CO₂ má vliv na celou řadu fyziologických procesů rostlin a proto je třeba studovat její vliv i na fotosyntetický aparát - anatomickou stavbu listu a ultrastrukturu chloroplastů. Cílem práce bylo vyhodnotit změny v ultrastruktuře chloroplastů listů buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ a různé ozáření. Druhým cílem bylo vyhodnotit, zda anatomické parametry ze střední části listu jsou reprezentativní pro celou čepel listu.

Stromy byly pěstovány ve dvou kultivačních sférách na experimentálním stanovišti Bílý Kříž Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i. v Moravskoslezských Beskydech. Listy byly odebrány v r. 2010 z juvenilních stromů buku lesního zasazených jako pětileté stromy v r. 2005 a rostoucích v aktuální koncentraci CO₂ (AC; 390ppm) a ve zvýšené koncentraci CO₂ (EC; 700 ppm).

Efekt EC se projevil ve zvýšeném poměrném zastoupení škrobu na mediálním řezu chloroplastů a nižším poměrném zastoupení intergranálních thylakoidů (IGT), zatímco poměr granálních thylakoidů ku intergranálním thylakoidům (GT/IGT) se zvýšil. Ozáření měla vliv zejména na uspořádání membránového systému thylakoidů. U stinných listů byl pozorován vyšší podíl jak GT, tak IGT. U podílu plastoglobulů byl pozorován trend ke zvyšování při EC a u slunných listů. Z výsledků je zřejmé, že oba sledované faktory mají vliv na ultrastrukturu chloroplastů listů buku.

Při porovnání referenčního vzorku segmentu ze středu listu se vzorky ze středu listu odebranými pomocí systematicky rovnoměrně náhodným výběrem (SUR) bylo zjištěno, že se liší v zastoupení granálních thylakoidů. Je možné uzavřít, že střed listu je referenční hodnota, která však není reprezentativní pro celou čepel listu.

Klíčová slova: chloroplasty, ultrastruktura chloroplastů, intergranální thylakoidy, granální thylakoidy, plastoglobuly, PSI, PSII, stereologické metody, thylakoidy, škrobová zrna.

ABSTRACT

Forest stands may act as important carbon storage places – sinks, due to carbon allocation into both the plant biomass in the process of photosynthesis and the soil. Enhancement of CO₂ concentration affects a whole range of plant physiological processes and, thus, it is necessary to study its effect on photosynthetic apparatus - leaf anatomical structure and chloroplast ultrastructure. The first aim of the Thesis was to evaluate changes in chloroplast ultrastructure of common beech (*Fagus sylvatica* L.) under the effects of both elevated CO₂ concentration and different irradiance. The second aim was to evaluate if the anatomical parameters obtained from the middle part of the leaf are representative for the whole leaf blade.

The trees were grown in glass domes at the Bílý Kříž experimental site in the Beskids Mountains (Czech Republic), owned by the CzechGlobe Institute. Leaves were sampled in 2010 from juvenile trees, which were planted in 2005 being 5-year old and cultivated since then in ambient (AC; 390 micromol/mol) and elevated (EC; 700 micromol/mol) CO₂ concentrations.

The EC effect was recorded to be an increased proportion of starch grains in the chloroplast median section and decreased proportion of intergranal thylakoids (IGT) while the ratio of granal to intergranal thylakoids (GT/IGT) increased. The effect of irradiance was observed particularly in the arrangement of thylakoid membrane system. Shade leaves exhibited higher proportion of both GT and IGT. A trend of higher proportion of plastoglobuli was observed for chloroplasts from EC-treated and sun leaves. The present results show that both studied factors have their effect on chloroplast ultrastructure.

When comparing reference sample of leaf segment with the segments sampled by systematic uniform random sampling (SUR) it was revealed that proportion of granal thylakoids in the reference sample differed from other segments. It is possible to conclude that the middle part of the leaf offers a reference value though not representative for the whole leaf blade.

Key words: chloroplasts, chloroplast ultrastructure, intergranal thylakoids, granal thylakoids, plastoglobuli, PSI, PSII, stereological methods, thylakoids, starch grains.

OBSAH

OBSAH	7
1. ÚVOD	9
1.1 Cíle a hypotézy práce.....	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
2.1 Ultrastruktura chloroplastů.....	12
2.1.1 Membránový systém	13
2.1.2 Plastoglobuly	18
2.1.3 Škrob.....	21
2.1.4 Stroma	22
2.2 Metody studia ultrastruktury chloroplastů.....	23
2.2.1 Kvantitativní vyhodnocení.....	23
2.2.2 Kvalitativní vyhodnocení ultrastruktury a 3D rekonstrukce.....	27
2.3 Působení zvýšené koncentrace CO ₂ a ozářenosti na rostliny.....	33
2.3.1 Působení zvýšené koncentrace CO ₂ na vybrané fyziologické procesy	34
2.3.2 Ozářenost a její vliv na ultrastrukturu chloroplastů	37
2.3.3 Změny v ultrastruktuře chloroplastů při zvýšené koncentraci CO ₂ a vliv dalších faktorů	42
2.4 Gradienty anatomických parametrů v rámci čepele listu	45
3. MATERIÁL A METODY.....	46
3.1 Odběr vzorků listoví.....	46
3.2 Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)	48
3.3 Stanovení vybraných strukturálních parametrů chloroplastů pomocí stereologických metod..	50
3.3.1 Aplikace bodové metody v programu Ellipse	51
3.4 Statistické metody	52
4. VÝSLEDKY	52
4.1 Optimalizace řezu pro kvantitativní vyhodnocení.....	52
4.2 Vyhodnocení změn v ultrastruktuře chloroplastů buku lesního pod vlivem zvýšené koncentrace CO ₂ a různé ozářenosti	56
4.3 Variabilita ultrastruktury chloroplastů v rámci listu.....	63
5. DISKUSE	71
5.1 Diskuse experimentálních systémů	71
5.2 Diskuse použitých metodických přístupů	73

5.3 Vliv různé ozáření na ultrastrukturu chloroplastů	75
5.4 Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ a dalších faktorů prostředí na ultrastrukturu chloroplastů	79
5.5 Variabilita ultrastruktury chloroplastů v rámci listu.....	83
6. ZÁVĚR	85
7. ZDROJE A CITOVANÁ LITERATURA	87

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	rychlost asimilace CO ₂
AC	ambient concentration, aktuální koncentrace CO ₂
A _{max}	světlem saturovaná rychlost asimilace CO ₂ (μmol m ⁻² s ⁻¹)
EC	elevated concentration, zvýšená koncentrace CO ₂
FAR	fotosynteticky aktivní radiace
FS	Freeze Substitution, mrazová substituce
GT	granální thylakoidy
GT/IGT	poměr granálních ku intergranálním thylakoidům
HPF	High Pressure Freezing, metoda vysokotlakého zmrazování
IGT	intergranální thylakoidy
ppm	pars per milion, miliontina (10 ⁻⁶)
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
LHC I	světloběrný protein – pigmentový komplex I (Light Harvesting Complex I)
LHC II	světloběrný protein – pigmentový komplex II (Light Harvesting Complex II)
SUR	systematicky rovnoměrně náhodný výběr
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

1. ÚVOD

Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého CO₂ je v posledních letech velice diskutované téma. Oxid uhličitý je jedním z hlavních skleníkových plynů a jeho vyšší obsah v atmosféře by mohl vést ke globálnímu oteplování Země. Zvýšení teploty, byť jen o 2°C, by znamenalo výrazný zásah do rovnováhy fungování ekosystémů. Rostliny přijímají atmosférický CO₂ a fotosyntézou ho zabudovávají do svých pletiv. Rozsáhlé lesní porosty mohou fungovat jako významná úložiště uhlíku, díky jeho ukládání do půdy a rostlinné biomasy, a mít tedy potenciál snižovat množství CO₂ v atmosféře. K uvolňování oxidu uhličitého do atmosféry dochází z rostlinné biomasy respirací, což je opačný proces k fotosyntéze. Zvýšená koncentrace CO₂ vede k vyšší rychlosti fotosyntézy, nárůstu rostlinné biomasy, a tedy i ke zvýšenému množství oxidu uhličitého, který se následně dostane do ovzduší procesem respirace. Zvýšená koncentrace CO₂ vede k rychlejší asimilaci oxidu uhličitého a tím pádem i produkci asimilátů. Tyto cukerné asimiláty se ukládají do chloroplastů buněk ve formě asimilačního škrobu. Škrobová zrna tak mohou narušovat membránový systém thylakoidů v chloroplastu.

Zvýšená koncentrace CO₂ má vliv tedy nejen na fotosyntézu, ale také na vodní provoz rostlin, primární produkci rostlin, či stavbu fotosyntetického aparátu. Existuje zde velice úzká hranice mezi tím, zda budou lesní porosty zdrojem či sinkem CO₂. Nejen tato významná role lesů v globálním cyklu uhlíku vede k potřebě co největšího porozumění vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na funkci dřevin na všech hierarchických úrovních – od úrovně ekosystémů až po subcelulární úroveň, včetně anatomické stavby rostlin.

Mnoho vědeckých týmů se tématem zvýšené koncentrace CO₂ zabývá a snaží se přispívat svojí prací k hlubšímu porozumění vztahu mezi atmosférickou koncentrací CO₂ a procesy probíhajícími v rostlinách.

Autorka předkládané práce je součástí týmu prof. Albrechtové, který se dlouhodobě zabývá vlivem zvýšení koncentrace CO₂ na dřeviny. Tato práce je součástí projektu GAČR „Vliv zvýšené koncentrace CO₂ a ozářenosti na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních“, a je propojena s dalším výzkumem členů řešitelského kolektivu grantu z pracovišť Katedry experimentální biologie rostlin a Katedry

genetiky a mikrobiologie PŘF UK v Praze, Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. a Laboratoře ekologické fyziologie rostlin Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i.

K vyhodnocování ultrastruktury chloroplastů byly použity stereologické metody, které poskytují nevychýlená měření a odhady kvantitativně anatomických parametrů rostlin. Předkládaná práce tak poskytuje nevychýlené odhady parametrů ultrastruktury chloroplastů a umožňuje tak provést hodnověrné posouzení vlivu zvýšené koncentrace CO₂ a rozdílné ozáření na stavbu chloroplastů a ukládání škrobu v listech buku lesního.

Práce je členěna standardním způsobem. V Literárním přehledu jsou shrnuty poznatky o ultrastruktuře chloroplastů, metodách jejího zkoumání a faktorech, které ultrastrukturu ovlivňují. V části „Metodika“ je popsán design odběru vzorků listoví a postupy použité při dosahování experimentálních cílů. Poté následuje kapitola s výsledky experimentů („Výsledky“). V kapitole „Diskuze“ jsou výsledky experimentů diskutovány spolu s metodickými postupy. Poslední částí je „Závěr“ shrnující nejvýznamnější výstupy práce.

1.1 Cíle a hypotézy práce

Cíle:

1. Vyhodnocení změn v ultrastruktuře chloroplastů buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ a různé ozáření.
2. Vyhodnocení, zda kvantitativně vyjádřené parametry ultrastruktury chloroplastů ve střední části listu buku lesního mohou být považovány za reprezentativní pro celou čepel listu.

Hypotézy:

K níže uvedeným hypotézám jsme dospěla na základě informací z nastudované literatury.

Je dokázáno, že EC vede k rychlejší asimilaci oxidu uhličitého (Kosvancova *et al.*, 2009) a tím pádem dochází k nárůstu produkce asimilátů. Tyto cukerné asimiláty, pokud nejsou využity v jiné části rostliny, se ukládají do chloroplastů buněk ve formě asimilačního škrobu.

Škrobová zrna tak mohou narušovat membránový systém thylakoidů v chloroplastu (Pritchard *et al.*, 1997; Teng *et al.*, 2006).

Při nižší ozářenosti rostlina potřebuje absorbovat více slunečního záření, a tak investuje do vybudování gran, která efektivněji slouží k absorpci excitační energie, díky přítomnosti anténních komplexů LHCI a fotosystémů II (Kirchhoff, 2013).

1. Dlouhodobá kultivace buku lesního ve zvýšené koncentraci CO₂ povede ke změnám v ultrastruktuře chloroplastů.

Zvýší se:

- poměr intergranálních thylakoidů ku granálním thylakoidům, obsahujících fotosystém II
- poměrné zastoupení škrobu i počet škrobových zrn

2. Nižší ozářenost bude mít vliv na ultrastrukturu chloroplastů buku lesního.

U stinných listů bude oproti slunným vyšší:

- plocha mediálního řezu chloroplastu
- poměr granálních thylakoidů ku intergranálním thylakoidům

U stinných listů bude nižší:

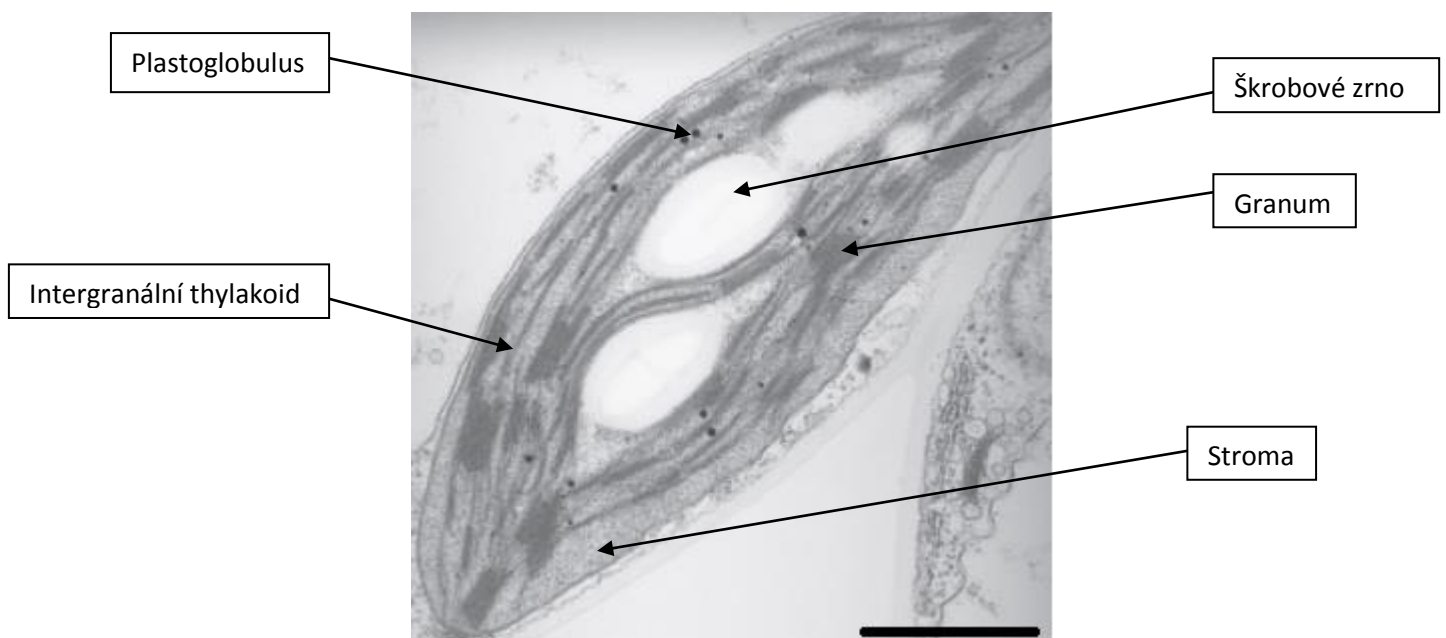
- poměrné zastoupení škrobu i počet škrobových zrn
- poměrné zastoupení plastoglobulů

3. Kvantitativně vyjádřené parametry ultrastruktury chloroplastů ve střední části listu mohou být považovány za reprezentativní pro celou čepel listu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Ultrastruktura chloroplastů

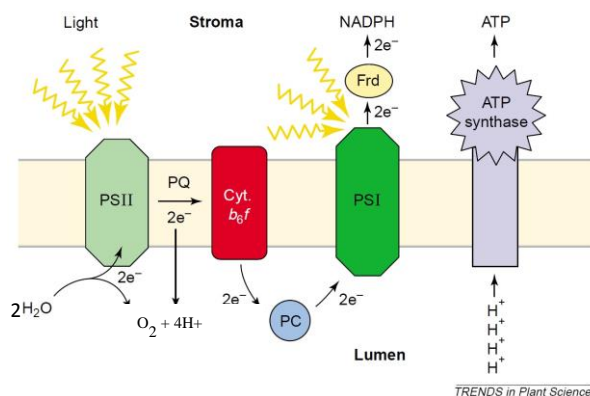
Chloroplasty jsou jedním typem barevných plastidů u rostlin, jejichž hlavní úlohou je fotosyntéza. Tento proces, při kterém dochází k přeměně energie ze slunečního záření na energii chemických vazeb, se odehrává na membránách thylakoidů. Chloroplasty patří mezi semiautonomní organely, obsahují vlastní DNA a ribozomy. Během evoluce došlo k přesunu některých genů, nezbytných pro fotosyntetickou funkci, do jádra buňky. Jedná se například o geny kódující malou podjednotku enzymu Rubisco (Terashima *et al.*, 2006). Dochází tedy k neustálé výměně informací mezi jádrem a mimojadernou DNA. Dále se v chloroplastu nachází asimilační škrob a lipoproteinové partikule – plastoglobuly. Všechny tyto části jsou obklopeny bílkovinnou hmotou, tzv. stromatem. Ve stromatu probíhá řada enzymatických reakcí, např. Calvinův cyklus, či syntéza a degradace škrobu. Chloroplast je od okolního prostředí oddělen dvěma membránami, mezi nimiž je mezimembránový prostor neprotoplazmatického charakteru. Jednotlivé struktury chloroplastu jsou zobrazeny na obr. 2.1.



Obr. 2.1 Snímek chloroplastu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu. Úsečka znázorňuje délku 1 μm . Autor: Anna Vrbová.

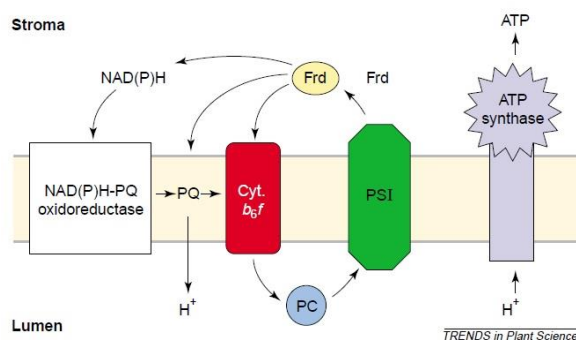
2.1.1 Membránový systém

Thylakoidy jsou ploché membránové vaky, které vznikly oddělením z vnitřní membrány chloroplastu. Vnitřní část thylakoidů vyplňuje neprotoplazmatický prostor neboli lumen. Membrány thylakoidů jsou specifické tím, že jsou na ně vázána lipofilní fotosyntetická barviva – chlorofyly a karotenoidy - která spolu s proteiny vytváří protein-pigmentové komplexy, nezbytné pro průběh primární fáze fotosyntézy. V primární fázi dochází k absorpci energie fotonů a její přeměně na chemickou energii molekul ATP a NADPH. Proteiny se na určitých místech thylakoidních membrán shlukují do komplexů, vytvářejí elektrontransportní řetězec a vzájemně spolupracují na přenosu energie elektronů. Mezi takto vytvořené skupiny proteinů patří: fotosystém I (PSI), fotosystém II (PS II), cytochromový komplex b_6/f (Cyt b_6/f) a ATP syntáza. Oba typy fotosystémů se skládají z centrální části (reakční centrum, jádro, RC), kterou obklopuje světlosběrný protein - pigmentový komplex (Light Harvesting Complex, LHC), nebo též anténa. Na tyto komplexy jsou vázána fotosyntetická barviva (chlorofyly a karotenoidy). Funkcí antén je zachycování a přenos excitační energie do reakčního centra fotosystémů. Po absorpci fotosynteticky aktivního záření (fotosynteticky aktivní radiace, FAR) a přenosu energie do reakčních center fotosystémů dochází k řadě oxidačně-redukčních reakcí, které vedou ke vzniku NADPH a také protonového gradientu na membráně thylakoidů. Při průchodu protonů z lumen do stromatu přes ATP syntázu dochází ke vzniku ATP (Taiz *et al.*, 2006; Votrubová & Olga, 2011). Při lineárním elektronovém transportu dochází k oxidaci vody ve fotosystému II (PSII). Vedlejším produktem oxidace vody v proteinovém komplexu OEC (oxygen evolving complex) je kyslík; poté jsou elektrony transportovány přes plastochinon (PQ), cytochromový komplex b_6f (Cyt. b_6f) a plastocyanin (PC), který redukuje fotosystém I (PSI). Zároveň dochází k redukci ferredoxinu (Frd), který redukuje NADP na NADPH. Cesta lineárního transportu elektronů je spojena s výrobou ATP díky enzymu ATP syntáza. Aby došlo k přenosu jednoho elektronu, jsou zapotřebí 2 kvanta světelného záření – jedno je absorbováno PSII a druhé PSI (je zapotřebí nejméně 8 kvant světelného záření na výrobu jedné molekuly kyslíku). Zatímco 2 elektrony projdou lineární cestou až na NADP, šest protonů je přesunuto do lumen thylakoidů. Na vytvoření jedné molekuly ATP jsou zapotřebí čtyři protony. Čistým výtěžkem je výroba 1,5 molekuly ATP na 1 molekulu NADPH. Schéma lineárního elektronového transportu je zobrazeno na obr. 2.2.



Obr. 2.2 Při lineárním elektronovém transportu dochází k přenosu elektronů přes fotosystémy I, II a mobilní přenašeče. Protony se hromadí v lumen thylakoidů a prochází přes ATP syntázu. Výsledkem jsou molekuly ATP a NADPH (Převzato z Albertsson, 2001).

Kromě necyklického přenosu je možný i cyklický přenos elektronů (Obr. 2.3), při kterém se elektrony přenesou z třetího ferredoxinu na cytochrom b_6f a pomáhají tak zvyšovat přenos vodíkových protonů (H^+) ze stromatu do dutiny thylakoidů. Protony v dutině thylakoidů jsou využity k výrobě ATP (fotofosforylaci). Tento způsob přenosu elektronů nedává vznik NADPH.



Obr. 2.3 Při cyklickém přenosu elektronů dochází k redukci ferredoxinu fotosystémem I (PSI), který zpětně redukuje cytochromový komplex b_6f , a to buď přímo, nebo přes plastoquinon. Cytochromový komplex b_6f poté redukuje plastocyanin, který následně redukuje PSI. Cyklický přenos elektronů je spojen se syntézou ATP, díky průchodu protonů přes ATP syntázu. Při tomto způsobu přenosu protonů nedochází k tvorbě NADPH (Převzato z Albertsson, 2001).

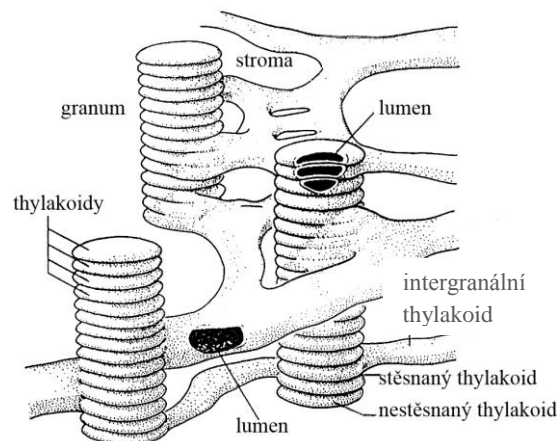
Sekundární fáze fotosyntézy, tzn. Calvinův cyklus, probíhá ve stromatu chloroplastu.

Více o stromatu v kapitole 2.1.4.

Membránový systém thylakoidů probíhá celým chloroplastem (Obr. 2.4). Na některých místech se thylakoidy skládají a vytvářejí grana, neboli granální (stěsnané)

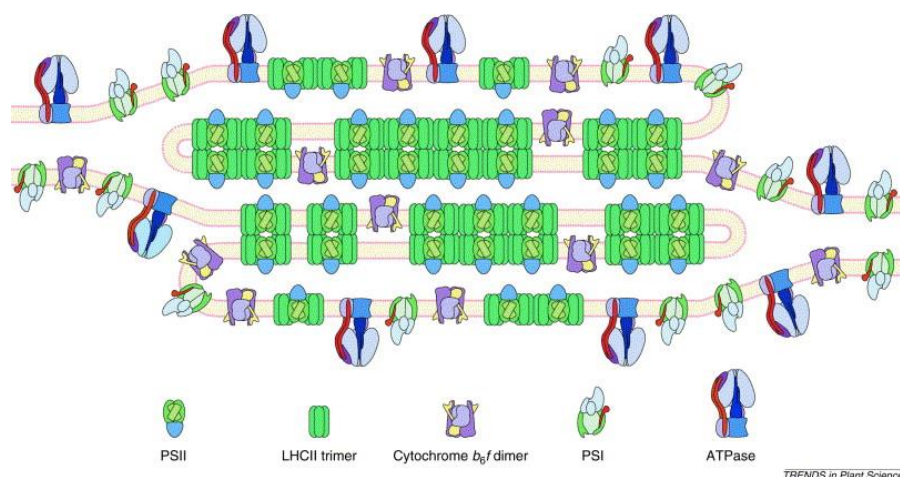
thylakoidy. Průměrná výška gran se u vyšších rostlin pohybuje v rozmezí 300 – 600 nm (Anderson, 1999). Jednotlivé thylakoidy, spojující grana mezi sebou, se nazývají intergranální (nestěsnané) thylakoidy.

V literatuře se také můžeme setkat s termínem stromatální thylakoidy místo intergranální thylakoidy. Vzhledem k tomu, že celý membránový systém je obklopen stromatem, přikláním se k označení intergranální thylakoidy a budu ho používat v celé mé práci.



Obr. 2.4 Membránový systém chloroplastu. Na některých místech se thylakoidy skládají a vytvářejí grana, neboli granální (stěsnané) thylakoidy. Jednotlivé thylakoidy, spojující grana mezi sebou, se nazývají intergranální (nestěsnané) thylakoidy. Uvnitř thylakoidů je neprotoplazmatický prostor – lumen. Okolí thylakoidů je vyplněno stromatem. (Převzato z: <http://www.yourarticlelibrary.com/plastids/plastids-important-kinds-of-plastids-1378-words/6309/>).

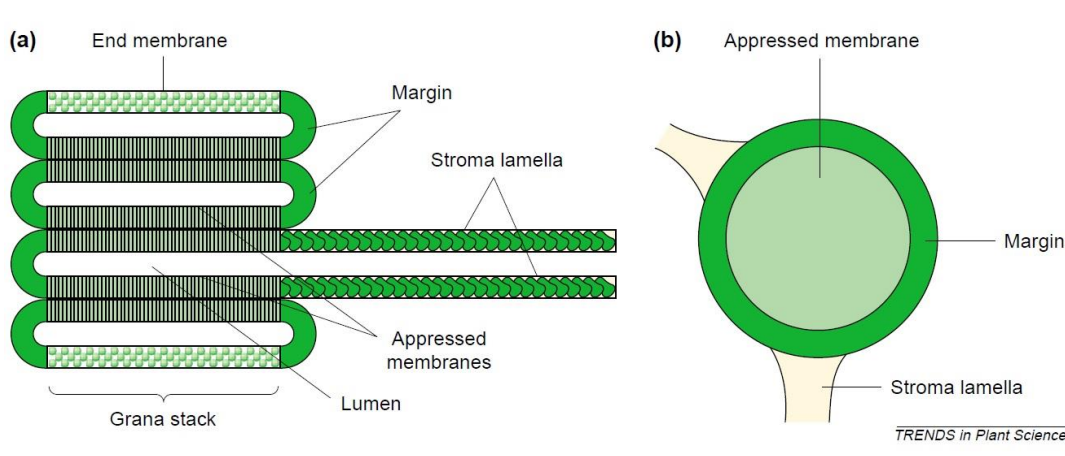
Rozložení proteinů, respektive fotosystémů mezi grany a intergranálními thylakoidy není náhodné (Albertsson, 2001). PSII spolu s trimerem LHC II se vyskytuje zejména v membránách granálních thylakoidů. Důvodem je jejich plochý tvar, díky kterému mohou být uloženy v membránách, které jsou přitisknuté k sobě (Daum *et al.*, 2010; Kirchhoff *et al.*, 2011) PSI a ATP syntáza mají objemné výstupky (Amunts & Nelson, 2008) a jsou spolu s LHC I hlavně součástí membrán intergranálních. Komplex cytochrom b_6/f je rozdělen rovnoměrně mezi oba typy membrán (Kirchhoff *et al.*, 2004; Dekker & Boekema, 2005). Část fotosystémů II, která neasociuje s trimerem LHC II se vyskytuje i v intergranálních thylakoidech (Rumak *et al.*, 2012). Toto rozdělení je vidět na obr. 2.5. U granálních membrán může obsah proteinů dosahovat až 80% celkové plochy membrány (Kirchhoff *et al.*, 2004).



Obr. 2.5 Laterální heterogenita proteinových komplexů fotosystémů I a II, Cyt b_6f a ATP syntáza na thylakoidních membránách chloroplastu (Převzato z Allen & Forsberg, 2001).

2.1.1.1 Stavba gran

Podle některých autorů (Albertsson, 2001; Anderson *et al.*, 2008) se grana skládají z několika domén (Obr. 2.6). Tomu odpovídá i nehomogenní rozložení proteinů v jejich jednotlivých částech. (Albertsson, 2001) rozlišuje 4 části gran: koncová membrána (end membrane), vnitřní membrána (appressed membrane), okrajová část (margin) a membrána, která vybíhá v intergranální thylakoid (stroma lamellae). Okrajová část neboli margin, není pouze spojením mezi dvěma membránami v granu, ale je specifickou doménou, která obsahuje PSI (Allen & Forsberg, 2001). Podle jiných autorů se na zakřivených částech gran nevyskytují žádné proteinové komplexy (Dekker & Boekema, 2005) z důvodu jejich velikosti (Armbruster *et al.*, 2013). Armbruster *et al.*(2013) zde ale detekovali malý polypeptid s názvem CURT 1, který je zodpovědný za velikost a počet thylakoidů v granech.



Obr. 2.6 Schéma domén thylakoidních membrán ukazuje grana spojená s intergranálními lamelami. (a) Příčný řez. (b) Granum při pohledu shora. Vnitřní membrány (appressed membrane) jsou odlišné od okrajové části membrány (margin), která je vystavená stromatu, od koncové membrány (end membrane) i od intergranálních thylakoidů (stroma lamellae). Vnitřní a koncové membrány jsou zpravidla ploché, zatímco okrajové části jsou zakřivené. Jednotlivé intergranální thylakoidy, které spojují grana, mají plochý a tubulární tvar. Z jednoho grana vychází několik intergranálních thylakoidů (Převzato z Albertsson, 2001).

2.1.1.2 Funkce gran

Proč dochází ke vzniku gran? Na tuto otázku se snaží vědci odpovědět již od doby jejich objevení v roce 1883 (Staehelein, 2003). U jiných oxygenních fotoautotrofních organismů, sinic či zelených řas se grana nevyskytují, nejsou tedy nezbytná pro oxygenní fotosyntézu (Mullineaux & Emllyn-Jones, 2005); (Anderson *et al.*, 2008). Proč tedy vznikla?

Někteří autoři (Staehelein, 2003; Dekker & Boekema, 2005) uvádí, že jedním z důvodů je rozdílná kinetika obou fotosystémů. Rychlost absorpce slunečního záření je vyšší v PSI než v PSII. Pokud by byly fotosystémy uloženy blízko sebe, mohlo by dojít k nekontrolovatelnému toku energie mezi PSI a PSII. Uspořádání thylakoidů do gran je tedy dobrým mechanismem, jak tomuto procesu, který se nazývá spillover, zabránit (Chow *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2008).

S tímto tvrzením ale nesouhlasí jiní autoři (Mullineaux & Emllyn-Jones, 2005), kteří dokazují, že u sinic se laterální heterogenita proteinových komplexů nevyskytuje, fotosystémy jsou uloženy v těsné blízkosti, a přesto u nich není elektronový transport nijak omezen. Navíc, výše zmíněný proces spillover, se u sinic neprojevuje více než u vyšších rostlin. Je zřejmé, že grana u vyšších rostlin hrají roli při regulaci toku energie mezi oběma

fotosystémy, ale není to jejich primární úloha. Více pravděpodobné se zdá, že se vyvinuly z jiného důvodu a tuto funkci postupně získaly (Mullineaux & Emlyn-Jones, 2005).

Další z autorů (Albertsson, 2001) navrhuje, že existence gran brání konkurenci mezi lineárním a cyklickým transportem, čímž umožňuje jejich samostatnou regulaci. Přítomnost gran je výhodná také v situaci, kdy dochází k fotopoškození PSII nadměrným ozářením. Všechny PSII nemohou být opraveny ve stejnou chvíli, a tak grana poskytují úložiště pro inaktivované PSII, aby se předešlo jejich předčasné degradaci (Chow *et al.*, 2005).

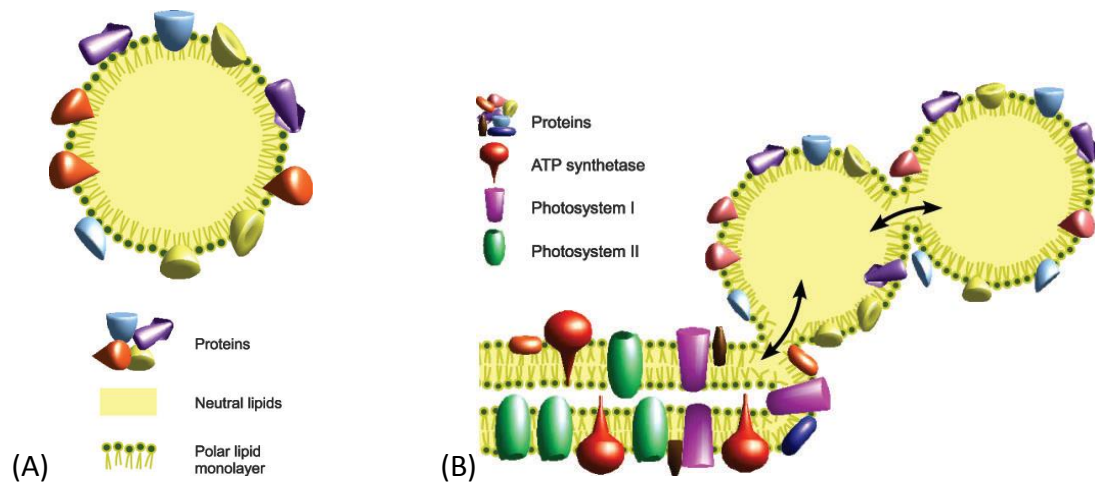
Z pohledu evoluce se nabízí jiný důvod pro uspořádání thylakoidů do gran. Terestrické rostliny se vyvinuly z řas, které byly adaptovány na odlišné světelné podmínky, než dnešní zelené rostliny. Po přechodu na souš, se ale rostliny a jejich fotosyntetický aparát musely přizpůsobit jiným světelným podmínkám, zejména růstu ve stínu (Anderson *et al.*, 2008). Proto došlo k vývoji gran, která poskytují PSII velmi rozsáhlou funkční anténu (LHCII), díky které dochází k zachytávání velkého množství energie ze slunečního záření. Tím je umožněn tok excitované energie thylakoidními membránami až k reakčnímu centru v PS II (Chow *et al.*, 2005). Tato hypotéza je v souladu s výsledky, získanými na rajčeti (*Lycopersicon esculentum* Mill. L., (Fu *et al.*, 2011), kdy při nižší ozářenosti autoři zaznamenali chloroplasty s větším počtem gran, než tomu bylo u rostlin pěstovaných při vyšší ozářenosti. Grana stinných chloroplastů navíc obsahovala více thylakoidů. Kvantitativní metoda, kterou k výsledkům autoři došli, však není uvedena.

Můžeme tedy shrnout, že díky uspořádání thylakoidních membrán do gran dochází ke zvýšení kapacity i účinnosti lineárního transportu elektronů. Grana tak na jedné straně stabilizují ultrastrukturu chloroplastu, na druhé straně ale umožňují určitou míru flexibility, která je nezbytná pro přizpůsobení se měnícím se podmínkám prostředí (Chow *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2008; Rumak *et al.*, 2012).

2.1.2 Plastoglobuly

Plastoglobuly jsou lipoproteinové částice vyskytující se v chloroplastech, ale i v jiných typech plastidů, např. chromoplastech (Brehelin *et al.*, 2007). V chromoplastech slouží k biosyntéze, ukládání a sekvestraci karotenoidů (Vishnevetsky *et al.*, 1999). Plastoglobuly mají na svém povrchu jednovrstevnou membránu složenou z lipidů, v níž jsou zakotveny proteiny (Brehelin & Kessler, 2008)(Obr. 2.7.A). Jejich průměrná velikost se pohybuje v rozmezí od 30

nm až do několika μm (Thomson & Platt, 1973) a je závislá na vývojové fázi rostliny a okolních podmínkách prostředí (Brehelin & Kessler, 2008).



Obr. 2.7 (A) Model struktury plastoglobulu. Plastoglobuly obsahují neutrální lipidy a jsou ohraničeny jednovrstevnou lipidovou membránou, ve které jsou zakotveny proteiny. (B) Model spojení plastoglobulů a thylakoidů. Fyzické propojení plastoglobulů a thylakoidů umožňuje obousměrný pohyb (znázorněn šipkami) metabolitů lipidů (Převzato z Brehelin & Kessler, 2008).

Protože velikost i počet plastoglobulů se liší v jednotlivých chloroplastech, ustupuje se od představy, že plastoglobuly slouží pouze jako pasivní úložiště lipidů. Existuje stále více důkazů, že se tyto částice účastní mnoha sekundárních metabolických drah a stresových reakcí (Brehelin *et al.*, 2007) a že dochází k transportu metabolitů lipidů mezi plastoglobuly a thylakoidy (Obr. 2.7 B).

Molekuly přítomné v plastoglobulech můžeme rozdělit do tří kategorií: 1. plastoglobuliny, 2. metabolické proteiny – enzymy a 3. zatím nezařazené proteiny (Brehelin *et al.*, 2007):

1. Plastoglobuliny jsou strukturální proteiny uložené na povrchu plastoglobulů (Austin *et al.*, 2006). Jsou zodpovědné za strukturu a regulaci velikosti a tvaru plastoglobulů. Hrají také svou roli při stresových situacích, kdy dochází k jejich akumulaci. Jeden z identifikovaných plastoglobulinů také chrání membrány, resp. fotosystémy před oxidativním stresem (Utriainen & Holopainen, 2001).
2. Molekuly účastníci se metabolických procesů jsou např. plastochinon (Paakkonen *et al.*, 1997; Langenkamper *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001), dále fylochinon (vitamin K1) a také tokoferol spolu s enzymy, které se podílejí na jejich syntéze (Paakkonen *et al.*,

1997; Utriainen & Holopainen, 2001), např. tokoferol cykláza (VTE1). Tento enzym se účastní předposledního kroku syntézy tokoferolu (Austin *et al.*, 2006), byl lokalizován na vnitřní straně membrány a je tedy ve styku s vnitřním prostředím plastoglobulu. Tokoferol patří mezi antioxidanty a chrání rostlinu např. před fotopoškozením a následnou fotoinhibicí (Brehelin & Kessler, 2008). Fotoinhibice je soubor procesů, které vedou ke snížené účinnosti fotosyntézy a poškození proteinových komplexů thylakoidních membrán.

3. Mezi identifikované, ale zatím nezařazené proteiny, patří proteiny účastníci se syntézy chinonu a její regulace (Ytterberg *et al.*, 2006).

Jak již bylo uvedeno, počet a velikost plastoglobulů v chloroplastech závisí na vývojové fázi rostliny i na stavu, ve kterém se rostlina nachází. Pokud je rostlina vystavena stresu různého druhu - např. nadměrná ozářenost, přítomnost bakterií (Brehelin *et al.*, 2007), těžkých kovů, osmotický stres, vodní stres (Munne-Bosch *et al.*, 2001), oxidativní stres - vede to k nárůstu počtu i velikosti plastoglobulů. Dochází k tvorbě plastoglobulových klastrů, ve kterých jsou jednotlivé plastoglobuly spojeny do útvaru připomínajícího korálky na řetízku. Stejný proces můžeme sledovat i v průběhu senescence listů. Při senescenci zároveň dochází k úbytku thylakoidních membrán. Předpokládá se, že se plastoglobuly podílí na katabolismu thylakoidů tím, že se do nich ukládají produkty vznikající při rozkladu thylakoidních membrán (Ghosh *et al.*, 1994). Dochází tedy k obousměrné výměně lipidů mezi plastoglobuly a thylakoidy. Plastoglobuly však nejsou spojeny s thylakoidy pouze funkčně, ale také strukturně. Vnější membrána thylakoidů přímo navazuje na membránu plastoglobulů, a to ve své zakřivené části (Obr. 2.7 B). Plastoglobuly vznikají jako puchýřky vnější membrány thylakoidů, podobně jako oleozomy vznikají odlučováním od membrány endoplazmatického retikula (Austin *et al.*, 2006) a zůstávají s ní spojeny po celou dobu své existence.

Plastoglobuly nesly dříve název osmiofilické globule (Brehelin & Kessler, 2008). Toto pojmenování vychází z přípravy vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM). V průběhu postfixace lipidů oxidem osmičelým dochází k reakci osmia s dvojnými vazbami lipidů, výsledkem reakce je vznik černého produktu. Proto jsou na výsledných mikrofotografiích thylakoidní membrány i plastoglobuly tmavě zbarvené (Hayat, 1970).

2.1.3 Škrob

Výsledkem primární, neboli světelné fáze fotosyntézy je syntéza ATP a redukovaného koenzymu NADPH. Energie uložená v těchto molekulách je použita v sekundární, neboli temnostní fázi fotosyntézy. V této fázi dochází k redukci CO₂ v Calvinově cyklu a syntéze asimilátů sacharidového typu. Energie ve formě monosacharidů je pak dostupná pro další procesy primárního metabolismu rostliny. Ve formě sacharidů je také energie transportována z chloroplastu do cytosolu buňky a poté floémem do dalších částí rostliny, kde fotosyntéza neprobíhá vůbec (např. kořeny, zásobní pletiva), nebo je nedostačující vzhledem k jejich potřebě (např. mladé listy). Nadbytek asimilátů se ukládá do zásobních polysacharidů, zejména škrobu, v podobě škrobových zrn. Škrobová zrna se ve zvýšené míře vyskytují v amyloplastech, což jsou specializované plastidy sloužící pro ukládání zásobního škrobu. Škrobová zrna se také nachází v chloroplastech, tento škrob se nazývá asimilační.

Škrob se ve dne ukládá do škrobových zrn, která v noci podléhají degradaci. Množství škrobu ani počet zrn v chloroplastu, tedy není stálý. Na konci dne je škrobu více a více je i škrobových zrn, než na konci noci. Velikost a tvar škrobových zrn je také druhově specifický (Cabalkova *et al.*, 2008).

U rostlin huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.) bylo zjištěno, že rychlost degradace škrobu je závislá na více faktorech, mezi něž patří velikost zrna a délka noci. Větší zrna podléhají degradaci rychleji. Rychlost degradace se přitom přizpůsobuje délce noci, respektive množství naakumulovaného škrobu. Rostlina je schopna rozpoznat množství škrobu, které bylo naakumulováno během dne a podle toho regulovat rychlost jeho degradace, aby byl plynule odbouráván během celé noci a nedošlo k jeho vyčerpání dříve, než skončí noc (Crumpton-Taylor *et al.*, 2012). Odlišná situace je u mutantů, kteří akumulují místo škrobu fytoglykogen. Tyto rostliny vyčerpají své zásoby fytoglykogenu ještě před skončením noci (Delatte *et al.*, 2005). Fytoglykogen je pozměněný produkt amylopektinu a patří mezi cukry rozpustné ve vodě. Je dvakrát více větvený než amylopektin a jeho řetězce se skládají z asi polovičního množství glukózových jednotek. Jeho bohaté větvení zabraňuje tvorbě nerozpustných krystalických oblastí, a proto je ve vodě rozpustný (James *et al.*, 1995).

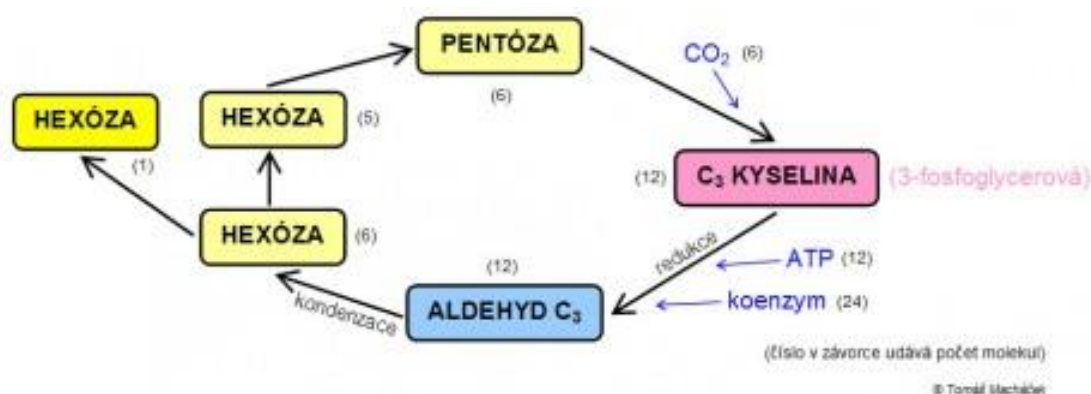
U huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.) bylo také zjištěno, že počet škrobových zrn v chloroplastu souvisí s objemem chloroplastu, objemem stromatu a také s vývojovou fází

listu - jejich počet je nižší v dospělých listech, oproti listům mladým, které se teprve vyvíjí. Při porovnání obsahu škrobu a počtu škrobových zrn bylo zjištěno, že v závislosti na světelných podmínkách dochází více ke změnám v objemu škrobových zrn, než v jejich počtu (Crumpton-Taylor *et al.*, 2012).

O vzniku škrobových zrn toho není moc známo. Crumpton-Taylor *et al.* (2011) předpokládají, že ke vzniku nových škrobových zrn dochází při expanzi chloroplastu, tedy v situaci, kdy dochází ke zvětšování jeho objemu. Nárůst objemu chloroplastů nastává při jejich dělení, je tedy možné, že vznik nových škrobových zrn je spojen se vznikem nových chloroplastů.

2.1.4 Stroma

Ve stromatu chloroplastů dochází k mnoha chemickým reakcím, mimo jiné také k zabudování CO_2 do molekul sacharidů v Calvinově cyklu (Obr. 2.8). Calvinův cyklus neboli C_3 -cyklus, získal svůj název podle prvních stálých produktů, složených ze tří atomů uhlíku, které při něm vznikají. Tento cyklus se skládá ze 3 fází: karboxylace neboli fixace CO_2 , redukce a regenerace ribulóza-1,5-bisfosfátu. Navázání CO_2 na ribulóza-1,5-bisfosfát je katalyzováno enzymem Rubisco (ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza). Touto reakcí vzniklý adiční produkt se štěpí na 2 molekuly 3-fosfoglycerátu. Ten se pomocí enzymů a NADPH redukuje na glyceraldehyd-3-fosfát. Vždy jedna molekula glyceraldehyd-3-fosfátu ze 6 opouští cyklus a syntetizují se z ní další látky (sacharidy, škrob, bílkoviny atd.). Ze zbývajících pěti molekul glyceraldehyd-3-fosfátu v regenerační fázi vznikají opět 3 molekuly ribulóza-5-fosfátu a jejich následnou fosforylací ATP vznikají 3 molekuly ribulóza-1,5-bisfosfátu. Calvinův cyklus se tak uzavírá. Ze tří molekul ribulóza-1,5-bisfosfátu a tří molekul CO_2 vzniknou tři molekuly ribulóza-1,5-bisfosfátu a jedna molekula glyceraldehyd-3-fosfátu. C_3 -cyklus využívají především C_3 rostliny. C_3 rostliny jsou rostliny mírného pásu, jejichž primárním příjemcem CO_2 je ribuloso-1,5-bisfosfát.



Obr. 2.8 Schéma Calvinova cyklu. V Calvinově cyklu dochází k zabudování molekuly CO_2 do molekul sacharidů, prvním stabilním produktem je molekula s třemi uhlíky (Převzato z <http://www.botanika-puchnerova.estranky.cz/fotoalbum/fotosynteza/calvinuv-cyklus.jpg.html>).

2.2 Metody studia ultrastruktury chloroplastů

K pochopení fyziologických funkcí rostlin, je nezbytné znát strukturu jednotlivých komponent, které jsou v těchto procesech zapojeny (Mustardy & Garab, 2003). Různé metody nabízejí různě detailní informace o struktuře rostlinného těla, respektive rostlinné buňky. Jednotlivé chloroplasty, jejichž velikost se pohybuje okolo $5\mu\text{m}$ (Wildeman *et al.*, 2004), můžeme pozorovat ve světelném mikroskopu. Pokud použijeme světelný mikroskop s fázovým kontrastem, nebo konfokální laserový skenovací mikroskop (CLSM) rozlišíme v rámci chloroplastu již grana a jejich uspořádání. Pomocí těchto metod také vznikaly první modely gran v chloroplastu (Wildman *et al.*, 2004). Pro vizualizaci ultrastruktury a organizace thylakoidních membrán v chloroplastu je potřeba použít metodu elektronové mikroskopie (Austin & Staehelin, 2011).

2.2.1 Kvantitativní vyhodnocení

Kvantifikace struktur je nezbytnou součástí procesu studia ultrastruktury chloroplastů, díky níž, můžeme získané výsledky statisticky vyhodnotit.

2.2.1.1 Stereologické metody

Stereologické metody jsou nástrojem pro kvantitativní vyhodnocení 3D charakteristik struktury objektů z 2D řezů nebo projekcí. Tyto metody jsou velmi přesné, ale také časově velmi náročné (Kubínova, 1993; Albrechtová *et al.*, 2007). Stereologické metody poskytují při správném naplánování experimentu přesný a nevychýlený odhad strukturálních parametrů. I

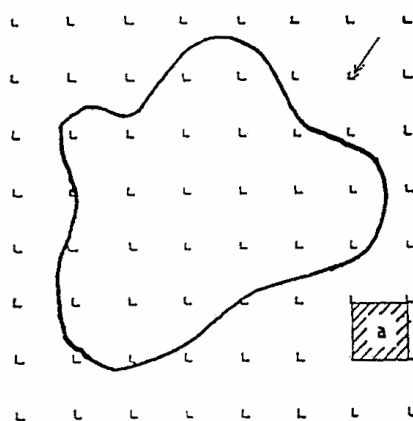
z důvodu časové náročnosti probíhá samotné měření na reprezentativním výběru, nikoliv na celém objektu. Výběrem může být např. mediální řez chloroplastem (Kutik *et al.*, 2004) .

Kvantitativní parametry objektů získáváme z jejich relativně malých částí – příčných řezů. Vybrané parametry daného objektu (poměrné zastoupení) jsou tak počítány jen v jeho specifické části (příčný řez). Abychom získali dostatečně přesný nevychýlený odhad parametru, tyto části musí být vzorkovány tak, aby byl zajištěn odhad blízký reálné hodnotě parametru bez systematické chyby. To je zajištěno systematicky rovnoměrným náhodným vzorkováním (SUR) (Gundersen & Jensen, 1987). Znamená to, že body testovacího systému či mřížka pro výběr testovacích oken, jsou uspořádány systematicky, rovnoměrně (pokrývají rovnoměrně celý list) a testovací mřížka se přikládá náhodně na studovaný objekt podle výběru čísla z tabulky náhodných čísel (Kubínová & Albrechtová, 1999)

Jednou z nejběžněji používaných stereologických metod je bodová metoda. Slouží k odhadu plochy objektu. U této metody je testovací systém složen z bodů (Obr. 2.9). Spočítají se body, které zasahují do sledované struktury a plocha (A) struktury je vypočítána podle vzorečku:

$$estA = P \times a$$

kde P je počet bodů, které zasahují do struktury a a je plocha, která náleží jednotce testovacího systému (Wiebel, 1979).



Obr. 2.9. Odhad plochy (A) pomocí bodové metody, a – plocha jednotky testovacího systému (Přavzato z Kubínová & Albrechtová, 1999)

Do každé měřené struktury by mělo zasáhnout přibližně sto bodů, aby byl odhad dostatečně přesný a výsledky statisticky vyhodnotitelné. Hustotu mřížky je tedy potřeba zvolit podle členitosti konkrétní struktury, kterou měříme, aby bylo splněno pravidlo dostatečného množství průsečíků.

Bodovou metodu použili autoři Kutík et al. (Kutík *et al.*, 2004; 2007) při vyhodnocování změn v ultrastruktuře chloroplastů u kukuřice (*Zea mays* L.) při působení mrazu. Zjistili, že ve stresových podmínkách došlo k nárůstu objemu chloroplastů a také se zvýšilo poměrné zastoupení (objemová hustota) plastoglobulů. Naopak došlo u stresovaných rostlin ke snížení poměrného zastoupení granálních i intergranálních thylakoidů v chloroplastech, aniž by se změnil poměr obou typů thylakoidů (Kutík *et al.*, 2004) .

2.2.1.2 Analýza obrazu

Princip analýzy obrazu spočívá v počítačovém vyhodnocení digitálního obrazu sledovaného objektu. Pro určení kvantitativních parametrů struktur je nejprve potřeba sledované struktury odlišit od pozadí či struktur mimo náš zájem, což je často prováděno metodou prahování. Prahování je založeno na myšlence, že objekty a pozadí mají rozdílnou úroveň intenzity – rozdílné hodnoty stupňů šedé. Je definovaný práh a každý pixel, který má menší hodnotu než tento práh je určen jako pixel pozadí a všechny ostatní jsou považovány jako pixely objektu. Výsledkem je binární obraz sledovaných objektů, jejichž další parametry (plocha, obvod atd.) jsou pak určeny v daném softwaru (např. ImageJ). Pokud nelze z důvodu malého kontrastu obraz naprahovat, je možné danou strukturu obkreslit ručně a počítačový software (např. ImageJ) vypočítá plochu daného objektu.

Tuto metodu využila Mgr. Anna Vičánková ve své diplomové práci (1998) (Vičánková, 1998) pro zjištění poměrného zastoupení chloroplastů v buňkách pochev cévních svazků u kukuřice seté (*Zea mays* L.).

Výhodou stereologických metod je jejich možné použití pro obrázky z transmisní elektronové mikroskopie (TEM), kde měřené struktury mnohdy nebývají dostatečně kontrastní pro možnosti prahování a převedení do binárního obrazu. Ruční obkreslování struktur je v takovém případě výrazně časově náročnější než stereologické vyhodnocení.

2.2.1.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je rychlá a efektivní metoda sloužící k separaci částic splňujících určitá kritéria z heterogenní populace.

Autoři Schröder & Petit (1992) díky této metodě dokázali rozlišit neporušené chloroplasty od poškozených, které představovaly pouze samotné thylakoidní membrány. Autoři se také zaměřili na zjištění rozdílného proteinového složení membrán v chloroplastu, a tedy rozdílného zastoupení proteinových komplexů v obalové membráně a membránách thylakoidů.

Metodu průtokové cytometrie využili také autoři (Crumpton-Taylor *et al.*, 2012) při měření obsahu škrobu v chloroplastech listů huseníčku (*Arabidopsis Thaliana* L.).

Výhodou je, že tato metoda není tak náročná na vybavení, ale není naopak tak přesná jako metoda FIB – SEM, která je více popsána v kapitole 2.2.1.4. U metody průtokové cytometrie je velká pravděpodobnost vzniku systematické chyby, a také při měření touto metodou musíme předpokládat stejnou hustotu škrobových zrn během denního cyklu. Další její nevýhodou je, že neposkytuje informace o objemu chloroplastu, ani o variabilitě v počtu granulí na chloroplast (Crumpton-Taylor *et al.*, 2012).

Aby mohla být průtoková cytometrie použita při měření škrobu v chloroplastech, musí být splněny dva předpoklady. Jedním z nich je fakt, že vzorky by měly obsahovat kromě chloroplastů a škrobových zrn ještě jiné částice. Zároveň by škrobová zrna měla být uvolněna z chloroplastů a vyskytovat se v suspenzi mimo ně (Yang *et al.*, 2002).

2.2.1.4 FIB – SEM

Princip metody Focused – ion beam Scanning electron microscopy (FIB – SEM) spočívá nejprve ve snímání povrchu vzorku iontovým paprskem ve skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Poté dojde k odstranění tenké vrstvy z povrchu vzorku (šířka řezu je 50 - 60 nm) a poté opět ke snímání povrchu vzorku (Armer *et al.*, 2009). Řezání vzorku a snímání povrchu je plně automatizováno a výsledkem je série obrazových dat, kterou je možné použít pro 3D rekonstrukci. Autoři Crumpton - Taylor *et al.* (2012) (Crumpton-Taylor *et al.*, 2012) použili tuto metodu k odhadnutí počtu škrobových zrn v chloroplastu u huseníčku (*Arabidopsis Thaliana* L.).

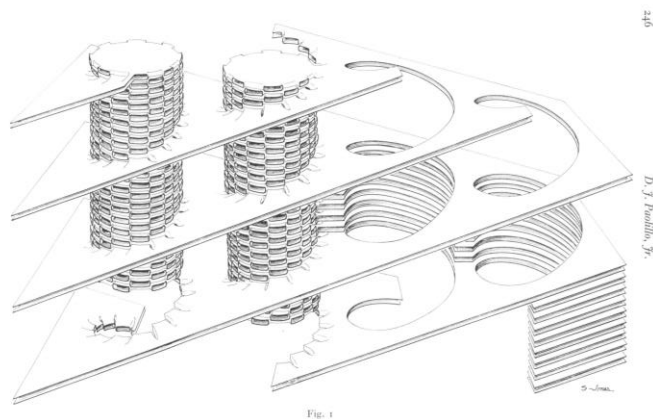
Touto metodou se získávala většina informací o struktuře chloroplastů ve 3D (Bushby *et al.*, 2011). Ve srovnání s krájením ultratenkých sériových řezů je tato metoda rychlejší, pohodlnější a přesnější, z hlediska možného prořezání celého vzorku. Za její největší nevýhodu je považován fakt, že při použití této metody dochází k postupnému obrušování a následnému znehodnocení vzorku. Nelze tedy postup u jednoho vzorku opakovat vícekrát (Crumpton-Taylor *et al.*, 2012).

2.2.2 Kvalitativní vyhodnocení ultrastruktury a 3D rekonstrukce

V literatuře se často setkáváme pouze s popisným (kvalitativním) hodnocením ultrastruktury chloroplastů bez jakékoliv kvantifikace. Důvodem může být velká časová náročnost kvantifikace. Mezi kvalitativní vyhodnocování struktur řadíme také různé modely uspořádání membrán v chloroplastu.

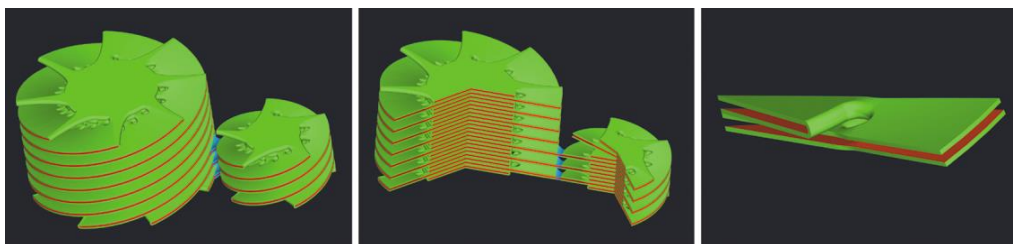
První model o 3D uspořádání membrán v chloroplastu pochází již ze 60. let od Wilhelma Menkeho (Mustardy & Garab, 2003; Shimoni *et al.*, 2005). Tento model ale nesplňuje podmínku kontinuity membránového systému, a tak je v dnešní době již překonán, stejně jako řada dalších modelů (Weier *et al.*, 1963; Andersson & Anderson, 1980; Anderson & Andersson, 1988).

Obecně uznávaný model thylakoidních membrán, pochází z roku 1970 (Paolillo, 1970) a dostal název helikální model. Jedná se o pravotočivou spirálu intergranálních thylakoidů, která se obtáčí okolo válcového grana a vytváří tak kontinuální systém (Obr. 2.10). Každé granum je spojeno se sousedním granem průměrně osmi intergranálními thylakoidy (Paolillo, 1970). Toto uspořádání vede ke kontinuitě membránového systému, k jeho stabilitě a souvislému vnitřnímu prostoru thylakoidů. Dalším znakem modelu je rozdílná poloha intergranální lamely v sousedních granech, které tento intergranální thylakoid spojuje. V neposlední řadě se tento model vyznačuje tím, že plocha membrán v granu není stabilní a může se lišit v rámci jednoho grana. Všechny tyto vlastnosti přispívají k věrohodnosti a přesnosti modelu (Mustardy & Garab, 2003).



Obr. 2.10 Helikální model. Jedná se o pravotočivou spirálu intergranálních thylakoidů, která se obtáčí okolo válcového grana a vytváří tak kontinuální systém (Převzato z Paolillo, 1970).

Také autoři Mustárdy a Garab přispěli k většímu povědomí o uspořádání membrán v chloroplastu, když vytvořili vizualizaci helikálního modelu na počítači (Mustardy & Garab, 2003)(Obr. 2.11).



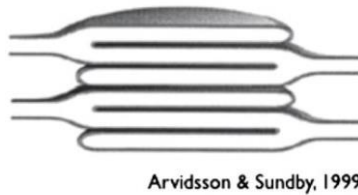
Obr. 2.11 Tři různé pohledy na 3D počítačový model spojení granum – intergranální thylakoid. Intergranální thylakoidy obvykle navazují na granální lamelu (Převzato z Mustardy & Garab, 2003).

Platnost helikálního modelu potvrdili i autoři Mustárdy a Jánossy v r. 1979 s pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), když se zabývali studiem izolovaných thylakoidních membrán (Mustardy *et al.*, 2008).

Hlavní znak helikálního modelu, tedy spirálovité uspořádání několika paralelních intergranálních thylakoidů okolo grana a jejich tubulární propojení, byl pozorován také pomocí metody mrazového lámání (Austin & Staehelin, 2011).

Mezi další modely patří model od autorů Arvidsson & Sundby z roku 1999 (Obr. 2.12). Tento model navrhuje, že každé granum je složeno z několika opakujících se jednotek. Každá

jednotka obsahuje tři granální disky, které jsou vytvořeny symetrickým vchlípením dvojice intergranálních thylakoidů (Daum & Kuhlbrandt, 2011).



Obr. 2.12 Model autorů Arvidsson and Sundby navrhuje, že se granum skládá z opakujících se jednotek a každá jednotka obsahuje tři granální disky, vytvořené symetrickým vchlípením dvou intergranálních thylakoidů. (Převzato z Daum & Kuhlbrandt, 2011).

2.2.2.1 Elektronová tomografie

Většina znalostí o 3D architektuře thylakoidních membrán vyšších rostlin je založena na analýze mikrofotografií z elektronového mikroskopu. Mikrofotografie jsou pořízeny snímáním ultratenkých řezů ze vzorků listů, nebo izolovaných chloroplastů.

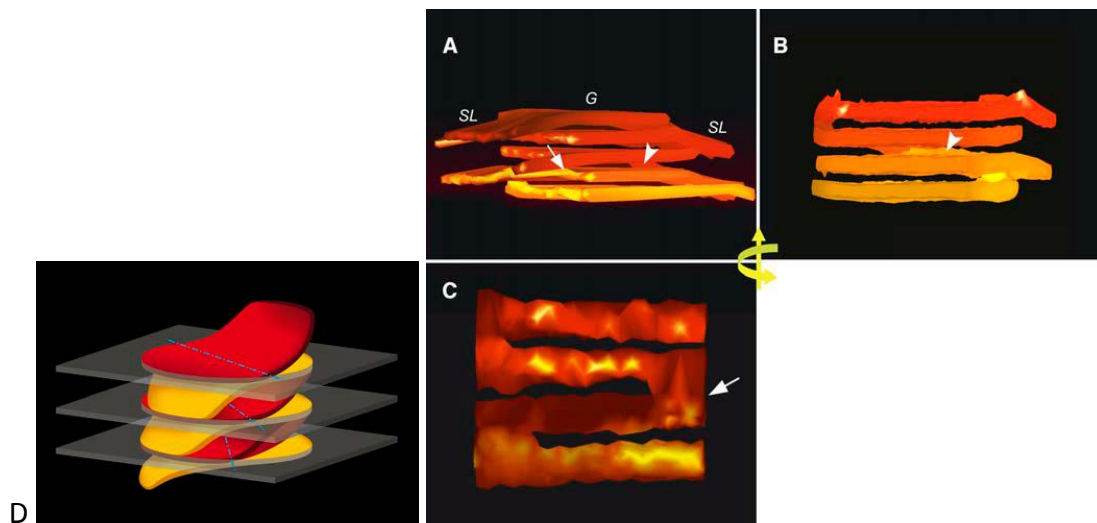
Nový pohled na ultrastrukturu chloroplastů přineslo využití elektronové tomografie. Tato metoda umožňuje biologické objekty pozorované v elektronovém mikroskopu zobrazovat v 3D prostoru. 3D informace je vytvořena snímáním sérií nakloněných projekcí a poté je zpracována počítačovým softwarem do výsledného 3D objemu.

První 3D tomografický model pochází od Shimoniho z roku 2005. Autor nepracoval s izolovanými chloroplasty, ale používal vzorky listů salátu (*Lactuca sativa* L.) připravené metodou vysokotlakého zmrazování (High Pressure Freezing - HPF) a mrazové substituce (freeze substitution - FS). Autor nesouhlasí s helikálním modelem v několika jeho znacích (Shimoni *et al.*, 2005).

Podle Shimoni *et al.* (2005) nejsou sousední grana mezi sebou propojena pouze intergranálními thylakoidy, ale vrstvy, které tvoří granum, jsou spojeny mezi sebou. Při jejich vzniku dochází k ohýbání a fúzi okrajů sousedních vrstev v granu.

Grana jsou tvořena opakujícími se jednotkami (Obr. 2.13). Každá jednotka se skládá ze dvou vrstev, které vznikly rozdělením intergranálních thylakoidů a jejich následnou fúzí. Horní vrstva thylakoidu se spojuje s membránou uloženou nad ní, dolní vrstva navazuje

na membránu pod ní (Shimoni *et al.*, 2005). Model helikální naopak upřednostňuje při vytváření grana vchlipování a skládání intergranálních thylakoidů.



Obr. 2.13 3D organizace propojení gran s intergranálními thylakoidy. (A) Granální lamely navazují na intergranální membrány thylakoidům, u kterých došlo při napojení na granum k rozdělení. Vnitřní spojení mezi sousedními vrstvami jsou označeny bílými šipkami a špičkami, G - granum; SL – intergranální thylakoidy. (B) a (C) Pro lepší zobrazení je struktura na obrázku A zvětšená, oříznutá a otočená o 20°(B) a 40° (C), a horní vrstvy jsou odstraněny. Spojení mezi sousedními vrstvami, která jsou označena bílými šipkami a špičkami, vznikají rozdělením intergranálního thylakoidu. Na všech obrázcích je struktura rozšířena podél osy z, aby byl dobře vidět vnitřní prostor grana.

D Topologický model grana. Granum se skládá z opakujících se jednotek, každá jednotka obsahuje dvě vrstvy (červená a žlutá), které vznikly rozdělením intergranálního thylakoidu (šedý). V každé jednotce, část vrchní vrstvy (červená) se ohýbá směrem vzhůru a spojuje se s vrstvou nacházející se na ní, zatímco druhá vrstva (žlutá) se ohýbá směrem dolů a splývá s vrstvou uloženou pod ní. Jak je znázorněno modrou přerušovanou čarou, při vzniku a připojování další jednotky, dochází k otočení proti směru hodinových ručiček o 25° podél osy grana. Vzdálenost mezi třemi jednotkami, které tvoří granum, byla pro srozumitelnost velmi zvětšena a zakřivené části, které jednotky spojují, zabírají významnou část jednotlivých vrstev grana.

Ve skutečnosti všechny vrstvy v granu k sobě těsně přiléhají a jsou uspořádány paralelně po celé své ploše; ohyby se vyskytují pouze na okrajích vrstev (Převzato Shimoni *et al.*, 2005).

Jsou ale také znaky, ve kterých se oba modely (helikální i Shimoniho) shodují. Shimoni tvrdí, že intergranální thylakoidy jsou uloženy rovnoběžně s grany, což nevylučuje ani helikální model na obr. 2.11 (Mustardy *et al.*, 2008).

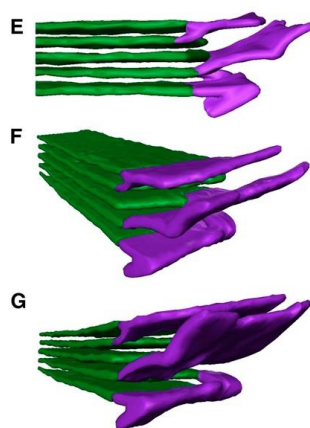
Kvůli negativnímu kontrastu membrán, ale mohou mít, podle některých autorů, Shimoniho vzorky horší rozlišení, čímž mohlo dojít ke vzniku chyb při překreslování membrán do modelu (Austin & Staehelin, 2011).

Shimoniho model se přiklání svými závěry více k modelům autorů Andersson & Anderson z 80. let. a Arvidsson & Sundby z let 90.

Další dva 3D modely získané pomocí elektronové tomografie (Mustardy *et al.*, 2008; Daum *et al.*, 2010) naopak helikální model podporují a tvrdí, že základní znaky helikálního modelu víceméně platí, jen je potřeba jeho zpřesnění.

Mustárdyho tým pracoval na izolovaných chloroplastech špenátu (*Spinacia oleracea* L.), které byly chemicky fixované. Membrány chloroplastů u těchto vzorků měly pozitivní kontrast, při kterém byly dobře viditelné. Výsledky Mustárdyho týmu jsou konzistentní s helikálním modelem z r. 1970 (Paolillo, 1970). Austin & Staehelin (2011) ale upozorňují, že izolované membrány nemusí odpovídat membránám v přirozených podmínkách.

Model od autorů Daum *et al.*, (2010) (Obr. 2.14) patří mezi první kryo – elektron tomografické studie. Přes své technické limitace se shoduje s helikálním modelem v tom, že grana jsou tvořena paralelními membránami a tyto membrány jsou propojeny přes intergranální thylakoidy (Daum *et al.*, 2010).



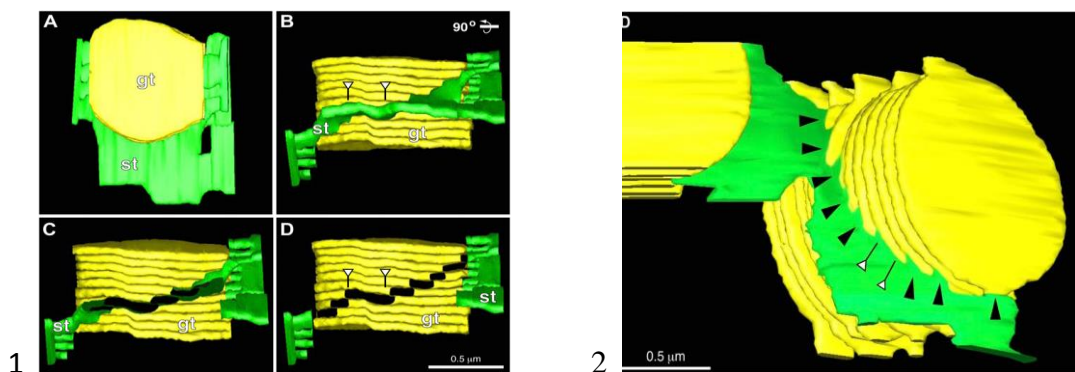
Obr. 2.14 Tomografický povrchový model propojení gran s intergranálními thylakoidy. Pro zjednodušení je každý thylakoid zobrazen jako samostatná deska. Spojení granálních disků (zelené) s intergranálními thylakoidy (fialové) na okrajích gran je zajištěno pomocí membránových výběžků, spíše než rozděvením intergranálních thylakoidů. Tento model je konzistentní s helikálním modelem uspořádání thylakoidních membrán, který uvádí autoři (Mustardy & Garab, 2003) a je vidět na obr. 2.11 (Převzato z Daum & Kuhlbrandt, 2011) .

Jeden z nejnovějších modelů, autorů Austin & Staehelin (2011) (Obr. 2.15), potvrzuje hlavní znaky helikálního modelu (Paolillo, 1970) - spirálovité obtočení grana intergranálními thylakoidy, cca 8 intergranálních thylakoidů na jedno granum, grana spojena přes

intergranální thylakoidy - a přináší nové poznatky o variabilitě spojení mezi intergranálními thylakoidy s grany a velikosti štěrbin, kterými intergranální thylakoidy navazují na thylakoidy granální.

Austin & Staehelin (2011) naměřili odlišné hodnoty velikosti štěrbin, než (Mustardy *et al.*, 2008). Rozdíl však mohl být způsoben použitím odlišné metody přípravy vzorků, protože (Austin & Staehelin, 2011) použili pro přípravu vzorků metodu vysokotlakého zmrazování, zatímco Mustardy *et al.* (2008) dal přednost chemické fixaci. U vzorků připravených chemickou fixací se často štěrbin objevují menší a pravidelně uspořádané.

Austin & Staehelin (2011) také předpokládají, že rostlina může velikost štěrbin měnit na základě měnících se podmínek prostředí, aby mohl být regulován tok iontů a membránových molekul mezi granálními a intergranálními membránami (Austin & Staehelin, 2011).



Obr. 2.15 Prostorové uspořádání různě velkých spojení mezi grany a intergranálními thylakoidy.

1. A je tomografický model ukazující pohled shora na granum (gt), spolu s napojenými intergranálními thylakoidy (st). B je tomografický model na obrázku A otočený o 90°. C je tomografický model na obrázku B, kde byly intergranální thylakoidy odstraněny, aby byly lépe viditelné místa spojení mezi intergranálními a granálními membránami (černě zvýrazněno). D je tomografický model, na kterém jsou všechny intergranální thylakoidy na přední straně grana odstraněny, aby byla odhalena všechna místa spojení mezi intergranálními a granálními membránami (černě zvýrazněno). Bílé špičky ukazují na spojení granálních a intergranálních membrán, které jsou delší než ostatní.

2. Tomografický model granálních a intergranálních thylakoidů. Černé špičky ukazují menší velikost štěrbin, zatímco bílé špičky ukazují 1 spojení mezi intergranálními a granálními membránami, které je asi dvakrát delší, než ostatní spojení (Převzato z Austin & Staehelin, 2011).

Model autorů (Austin & Staehelin, 2011) je tedy v rozporu s modely Andersson & Anderson (1980;1988), Arvidsson & Sundby (1999) a Shimoni *et al.* (2005) a vrací se zpět k helikálnímu modelu od Paoliliho ze 70. let.

Elektronová tomografie se využívá také na studium plastoglobulů. V roce 2006 publikovali autoři Austin *et al.* studii, ve které se zabývali propojením plastoglobulů s thylakoidními membránami chloroplastu. Uvádějí, že plastoglobuly se vyskytují buď jako samostatné subjekty, nebo v malých skupinách. V mladých listech se v chloroplastech vyskytuje více samostatných plastoglobulů, naopak při senescenci dochází k jejich hromadění a shlukování do skupin. Plastoglobuly jsou fyzicky propojeny s thylakoidními membránami. Vznikají jako puchýřky z vnější membrány v místech, kde dochází k jejímu zakřivení (Austin *et al.*, 2006).

Při tvorbě a aplikaci jakýchkoliv modelů je potřeba mít vždy na paměti, že modely jsou pouze idealizovanou interpretací reality a nemusí plně odpovídat skutečnosti (Daum & Kuhlbrandt, 2011).

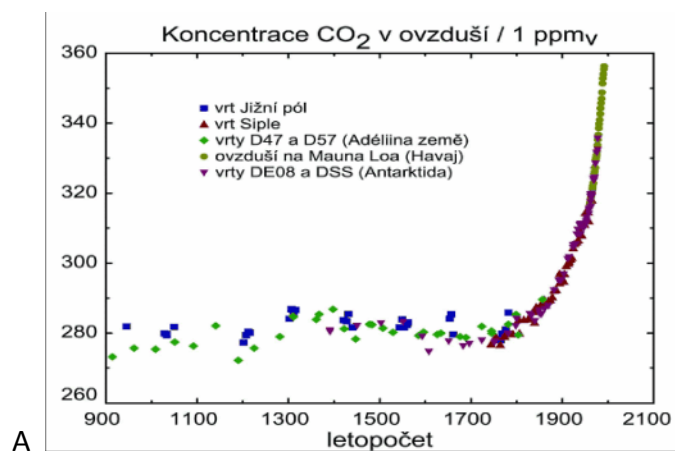
2.3 Působení zvýšené koncentrace CO₂ a ozáření na rostliny

Koncentrace CO₂ v atmosféře od nástupu průmyslové revoluce (přibližně od roku 1850) kontinuálně roste (Obr. 2.16 A) (Terashima *et al.*, 2014). Množství CO₂ v dnešní době dosahuje hodnoty 400 ppm (Obr. 2.16 B) a jeho nárůst se očekává i nadále. Významný podíl na zvyšování CO₂ v atmosféře mají i antropogenní faktory, zejména spalování fosilních paliv a změny ve využívání krajiny (Smith *et al.*, 2013).

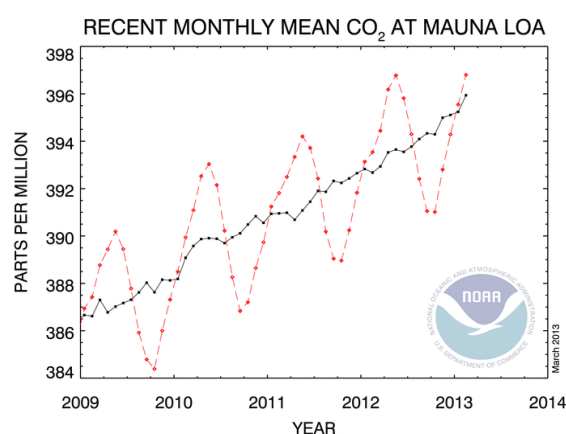
Jediný proces na Zemi, při kterém dochází k fixaci anorganického uhlíku do organické hmoty s použitím energie slunečního záření, je fotosyntéza. Rostliny přijímají atmosférický CO₂, zabudovávají ho do svých pletiv a zpřístupňují tak heterotrofním organismům organický uhlík. Rozsáhlé lesní porosty představují významná úložiště terestrického uhlíku a mají tak potenciál snižovat množství CO₂ v atmosféře (Dixon, 1994). Rostliny tedy patří mezi významné klimatotvorné činitele. EC má vliv nejen na klima, ale také na fyziologické procesy a strukturní parametry rostlin.

Ozáření je přirozený faktor prostředí, který ovlivňuje vývoj rostlin na mnoha úrovních. Některé rostliny jsou adaptované na vyšší ozáření, jiné jsou stínomilné. Také listoví v koruně stromů je různě adaptováno na dostupné světelné podmínky. Z některých předchozích studií vyplývá (Lhotakova *et al.*, 2012), že u smrku ztepilého (*Picea abies* L.) na

úrovni struktury mezofylu hraje ozáření důležitější roli než okolní koncentrace CO₂. Také ultrastruktura organel je ovlivněna různou ozářeností (více v kapitole 2.3.2.).



A



B

Obr. 2.16 (A) Graf ukazuje koncentraci CO₂ v atmosféře od roku 900 do současnosti (Převzato z <http://www.tzb-info.cz/6123-emise-co2-v-souvislostech>), (B) Graf ukazuje průměrnou měsíční koncentraci CO₂ v zemské atmosféře měřenou na sopce Mauna Loa na Havaji od roku 2009 do roku 2013. Červená křivka ukazuje průměrné měsíční hodnoty. Černá křivka reprezentuje trend po normalizaci na průměrný sezónní cyklus. 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 <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>).

2.3.1 Působení zvýšené koncentrace CO₂ na vybrané fyziologické procesy

Z literárních údajů vyplývá, že CO₂ je aktivátorem i substrátem pro fotosyntézu. Při EC tedy dochází ke zvýšení rychlosti fixace CO₂ (A), tvorby asimilátů, rychlosti růstu a stimulaci produkce biomasy (Marek, 2011).

Při krátkodobé aplikaci EC u většiny rostlin opravdu dochází k navýšení rychlosti asimilace CO₂ (Ghannoum *et al.*, 2000) a zároveň dochází k potlačení fotorespirační aktivity. Fotorespirace je proces, při kterém enzym Rubisco vykazuje oxygenázovou aktivitu, váže O₂

namísto CO₂ a tím dochází k uvolňování přebytečného CO₂. Na druhou stranu funguje fotorespirace za podmínek vysoké teploty a ozářenosti jako „zhášec“ nadměrných excitací, které mohou vést k nevratnému poškození proteinů zapojených zejména v transportu elektronů (Marek, 2011). Při fotorespiraci se také vytváří substráty pro syntézu látek uplatňujících se při stresových reakcích.

U rostlin, dlouhodobě vystavených EC je situace odlišná. Nejprve také dochází ke stimulaci rychlosti fixace CO₂ (A) (Holisova *et al.*, 2012; Tomimatsu & Tang, 2012), ale stimulace rychlosti klesá s délkou působení EC. Stav, kdy asimilační kapacita rostlin pěstovaných při EC je nižší, než u rostlin pěstovaných při AC se nazývá aklimační deprese. Příčin tohoto stavu je v literatuře uváděno hned několik: redistribuce či snížení koncentrace fosfátu (Urban, 2003; Ainsworth & Rogers, 2007); snížení obsahu či aktivity enzymu Rubisco (Kosvancova *et al.*, 2009; Hrstka *et al.*, 2012); mechanické poškození thylakoidů, kvůli masivnímu hromadění škrobu; inhibice transkripce enzymů, zapojených v syntéze sacharidů (Rubisco, karbonátdehydratáza); změny ve struktuře světlosběrných komplexů; změny poměru zdroj/sink CO₂ v rostlinách (Urban, 2003; Ainsworth & Rogers, 2007)

Dlouhou dobu se předpokládalo, že klimatická změna a EC povedou ke zvýšení produkce rostlin a ukládání uhlíku, díky důsledkům, které z toho plynou – např. nárůst listové plochy (Pritchard *et al.*, 1997), či delší růstová sezóna (Matyssek *et al.*, 2012) apod. Přesto stále probíhá diskuse na toto téma, protože je známo, že na rychlost fotosyntézy má vliv více faktorů, které mohou vzájemně interagovat a zmenšovat efekt EC - teplota, sucho, či dostupnost živin (Saxe *et al.*, 1998). Vzhledem k tomu, že v současné době probíhá klimatická změna, kromě EC jsou rostliny vystaveny celé řadě vzájemně interagujících stresových faktorů. Vliv dostatku a vyváženosti živin si všímají i jiní autoři (Matyssek *et al.*, 2012) Norby (Norby *et al.*, 2010) *et al.*, 2010). Někteří dokonce tvrdí, že dostupnost N je důležitým faktorem ovlivňující interakci zdroj – sink a fotosyntetickou kapacitu při EC (Zhao *et al.*, 2012).

U procesu respirace není odpověď na EC také jednoznačná. Respirace neboli buněčné dýchání, probíhá u rostlin ve dne i v noci. Dochází při ní k výrobě ATP, uhlíkatých skeletů, spotřebě O₂ a výdeji CO₂. Při krátkodobém působení EC dochází u stromů k jejímu nárůstu. U dlouhodobého působení EC dochází naopak k poklesu rychlosti temnostní respirace (Marek,

2011). K opačnému výsledku dopěli autoři (Ainsworth *et al.*, 2006; Leakey *et al.*, 2009), kteří studovali sóju (*Glycine max.* L.) a zjistili, že při dlouhodobém působení EC dochází k transkripčnímu přeprogramování rostlinného metabolismu, které vede ke stimulaci respirace.

EC má negativní vliv na stomatální vodivost rostlin (Medlyn *et al.*, 2001). K zavírání průduchů je zapotřebí depolarizace membrán. EC vede k procesům, které membránu depolarizují, tudíž dochází k snížení otevřenosti průduchů (Assmann, 1993). Hlavním důvodem ke snížení vodivosti je ale vyšší gradient vnější a vnitřní koncentrace CO₂. Síla reakce na EC se liší u jednotlivých životních forem rostlin. Největší odpověď byla pozorována u bylin, poté u listnatých dřevin a nejméně reagovaly na změnu koncentrace CO₂ jehličnany (Saxe *et al.*, 1998).

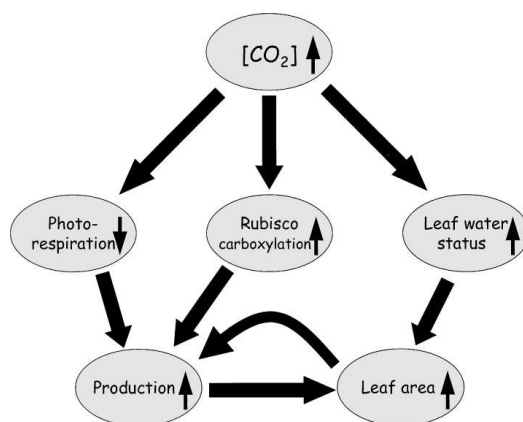
S přivíráním průduchů také souvisí pokles transpirace, což vede k částečnému poklesu vodního potenciálu listů. Krátkodobé působení EC také vede ke snížení transpirace, dlouhodobé působení EC naopak zapřičiňuje zvýšení transpirace z důvodu nárůstu biomasy kořenů a listů (Marek, 2011). Vyšší hodnoty specifického transpiračního proudu kmenem, i vyšší hodnoty vodního potenciálu letorostů mají za následek ekonomičtější využití vody (WUE) (Pokorny *et al.*, 2001; Kupper *et al.*, 2006).

EC vede podle některých autorů (Long *et al.*, 2004) ke stimulaci rychlosti růstu rostlin a produkce biomasy. S tímto názorem souhlasí i jiní autoři (Gessler *et al.*, 2007; Marek, 2011), kteří navíc tvrdí, že EC vede nejen ke stimulaci produkce biomasy u C₃ rostlin, ale také více asimilátů putuje do kořenů, dochází tedy k většímu příjmu živin, zejména dusíku z půdy. Další autoři (Smith *et al.*, 2013) také uvádí, že při EC dochází k nárůstu biomasy u listnatých dřevin. Zda dochází k nárůstu biomasy při EC je druhově specifické a také závisí na tom, zda stromy rostou v monokultuře, či v zapojeném porostu spolu s ostatními druhy. Některé výsledky ukazují, že při společném růstu buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) a borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) dochází ke stimulaci růstu nadzemní biomasy (Pretzsch & Schutze, 2009) oproti růstu v monokultuře. K opačným výsledkům dospěli autoři (Jacob *et al.*, 2010), kteří zjistili, že při růstu buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) ve smíšeném porostu, dochází ke snižování růstu biomasy oproti situaci, kdy roste buk lesní (*Fagus sylvatica* L.) samostatně

v monokultuře. U kořenů je ale situace opačná. V polykultuře je efekt EC větší, než při růstu stromů v monokultuře (Smith *et al.*, 2013).

Z globálního hlediska se dívá na situaci (Sage, 1994), který tvrdí, že EC může mít vliv na rozmístění C3 a C4 rostlin a také na samčí a samičí jedince u topolu, kteří odlišně reagují na změny související se EC (Zhao *et al.*, 2012). C4 rostliny, jejichž prvním stabilním produktem fotosyntézy je 4 uhlíkatá molekula, jsou adaptovány na život v teplejším podnebí. Také u nich neprobíhá proces fotorespirace.

Schematické znázornění přímých efektů EC na C3 rostliny je na obr. 2.17.



Obr. 2.17 Schematické znázornění přímých efektů zvýšené koncentrace CO₂ na produkci C3. Zvýšená [CO₂] zvyšuje rychlost karboxylace enzymu Rubisco, zatímco inhibuje jeho oxygenázovou aktivitu a tím snižuje fotorespirační ztrátu uhlíku. Zvýšená produkce vede k nárůstu listové plochy a zpětnovazebně pozitivně ovlivňuje rychlost fotosyntézy. Toto je dále zesíleno snížením transpirace a lepším hospodařením s vodou, které také vede k nárůstu listové plochy (Převzato z Long *et al.*, 2004).

2.3.2 Ozářenost a její vliv na ultrastrukturu chloroplastů

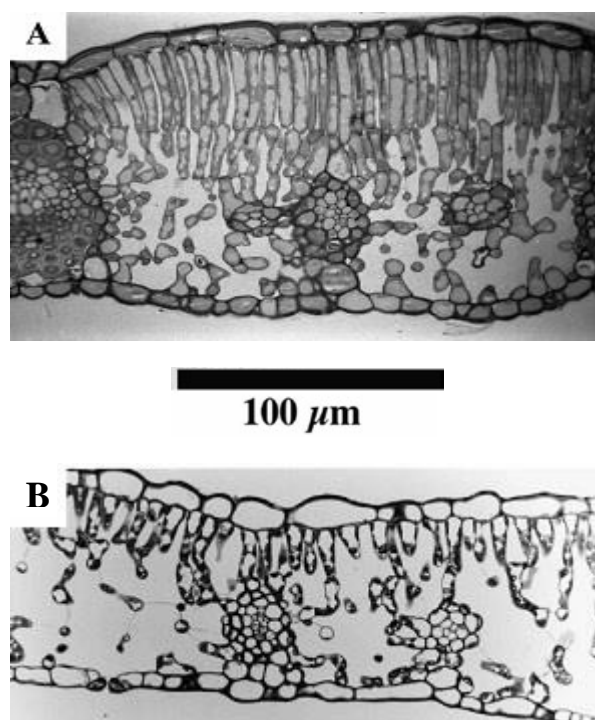
Dostupnost záření v rámci koruny není homogenní. Odpověď rostlin na světelné podmínky se liší v závislosti na druhu porostu, vývojové fázi listů a je ovlivněna také dalšími faktory (Niinemets, 2010). Na základě množství dopadajícího záření dochází k diferenciaci dvou typů listů, jedná se o slunný a stinný list. Daný typ je přizpůsoben světelným podmínkám nejen rychlostí fotosyntézy, ale zejména anatomickou stavbou mezofylu (Terashima *et al.*, 2006).

Při vyšší ozářenosti dochází k řadě procesů, které společně vedou k nárůstu A_{max} (světlem saturované rychlosti asimilace CO₂) u slunných listů (Hanba *et al.*, 2002; Terashima *et al.*, 2006; Oguchi *et al.*, 2008). U některých druhů dochází k prodlužování buněk

palisádového parenchymu, stejně jako k vícečetnému dělení buněk, jak je vidět na obr. 2.18 (Terashima *et al.*, 2006). Díky tomu jsou slunné listy tlustší a mají větší vnitřní povrch (povrch mezofylových buněk vystavený mezibuněčným prostorám). Na větší ploše buněčné stěny tedy dochází k příjmu CO₂ do buňky, následně do chloroplastů, kde je CO₂ přístupný pro enzym Rubisco.

U jiných druhů narůstá počet chloroplastů a více chloroplastů je vystaveno mezibuněčným prostorám, bez toho aniž by docházelo k nárůstu tloušťky listu (Oguchi *et al.*, 2008).

Některé druhy naopak investují více biomasy do vytvoření silných stinných listů, ale tyto listy obsahují málo chloroplastů vystavených mezibuněčným prostorám. Při přesunutí do vyšší ozářenosti naroste u těchto rostlin objem chloroplastů a zaplní se tím prázdná místa v mezofylových buňkách a dojde ke zvýšení rychlosti asimilace (Oguchi *et al.*, 2008).



Obr. 2.18 Slunný (A) a stinný (B) list buku (*Fagus Crenata* L.) (Upraveno podle Terashima *et al.*, 2006).

Také vývoj chloroplastu je ovlivněn lokálními světelnými podmínkami prostředí (Yano & Terashima, 2001; Terashima *et al.*, 2006).

Při dlouhodobém působení nižší ozáření bylo zjištěno, že dochází k navýšení počtu gran v chloroplastu a také k navýšení počtu thylakoidů v granech (Sarafis, 1998; Fu *et al.*, 2011). Obsah škrobu se při nižší ozáření v chloroplastu u rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.) snížil a počet plastoglobulů narostl (Fu *et al.*, 2011).

Velikost, počet i ultrastruktura chloroplastů jsou ovlivněny světelnými podmínkami také u orchideje (*Anoectochilus roxburghii* L.). Počet chloroplastů, gran a granálních membrán narůstá při nižší ozáření. Grana rostlin rostoucích při 30%, 20%, a 5% ozáření obsahovaly více thylakoidů v porovnání s těmi, které se vyskytovaly v rostlinách vystavených 50% ozáření. Počet a velikost osmiofilních granul byl redukován u rostlin rostoucích při 30% a 20% ozáření v porovnání s těmi, které byly v listech vystavených 50% a 5% ozáření (Shao *et al.*, 2014).

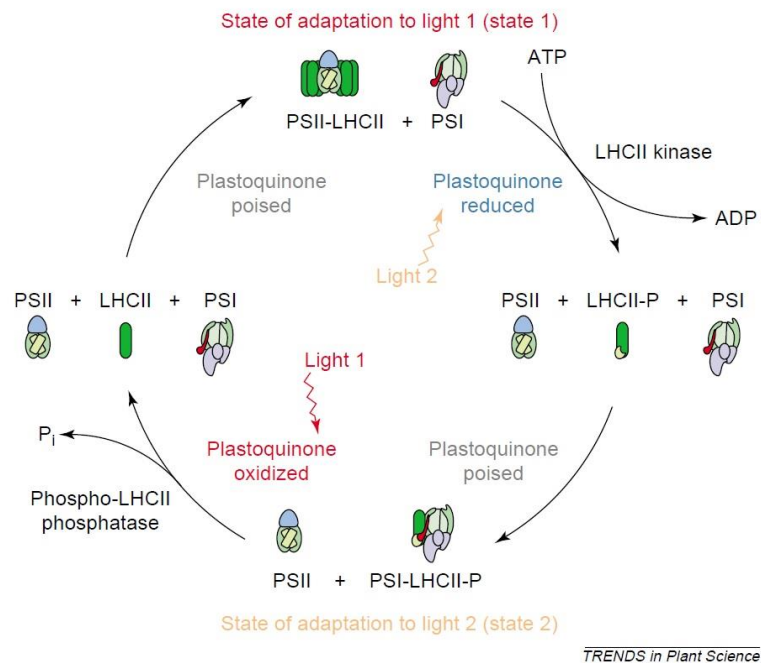
Různá stanoviště pro porovnání ultrastruktury chloroplastů pod vlivem ozáření zvolili autoři (Liang *et al.*, 2010). u rostliny fialky (*Primulina tabacum* L.). Zjistili, že při vyšší ozáření obsahují chloroplasty méně gran a grana jsou složena z méně thylakoidů, než u rostlin rostoucích při nižší ozáření. Důsledkem je nárůst plochy koncových membrán, které jsou vystaveny stromatu, čímž se zvyšuje účinnost toku protonů a vzniku ATP (Anderson *et al.*, 2012).

U špenátu (*Spinacia oleracea* L.) dochází při krátkodobém působení nízké ozáření k nárůstu velikosti a počtu gran v chloroplastech. Při přesunu zpět do vyšší ozáření, se membrány vracejí do původního stavu. Z toho plyne, že rostliny špenátu dokáží reagovat na měnící se světelné podmínky v horizontu několika minut tak, aby dosáhly maximální fotosyntézy a zároveň minimalizovaly dopady fotoinhibice (Rozak *et al.*, 2002).

Kromě dlouhodobé aklimace (hodiny, dny, týdny, sezóny) rostliny potřebují také dynamicky reagovat na měnící se světelné podmínky prostředí. Během evoluce se u nich vyvinuly takové mechanismy, které jim dovolují udržet konstantní maximální výtěžek fotosyntézy v podmínkách kolísajícího záření (Anderson *et al.*, 2012)

Jedním z regulačních mechanismů je state transition (Mullineaux & Emlin-Jones, 2005) (Obr. 2.19). V podmínkách ozáření, které vedou k nadměrné excitaci fotosystému II (PS II) na rozdíl od fotosystému I (PSI), je indukován stav 2, při kterém se část LHCI přesune z

PSII na PS I, čímž dojde k absorpci více energie fotosystémem I. Pokud dojde k nadměrné excitaci fotosystému I, dojde k navrácení stavu 1, ve kterém je více energie směřováno na PSII. Výsledkem je rovnoměrnější rozložení slunečního záření mezi oba fotosystémy (Mullineaux & Emlyn-Jones, 2005).

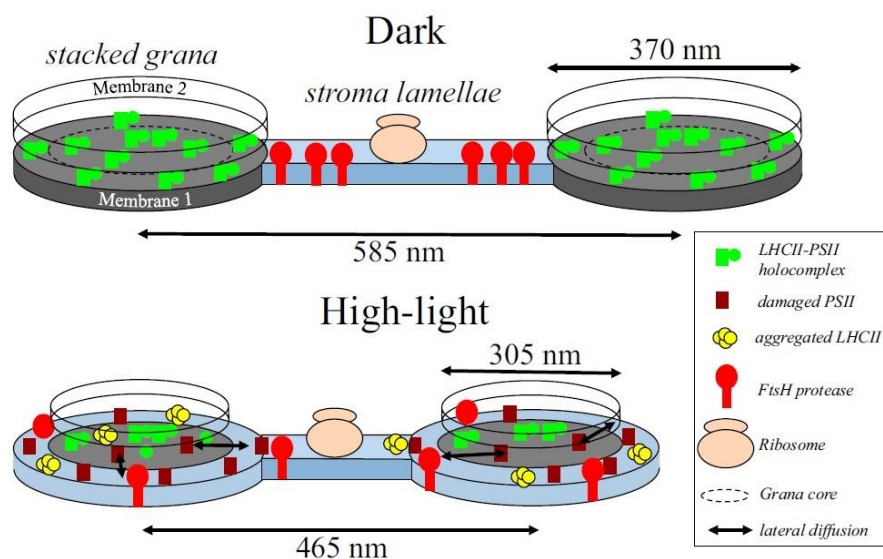


Obr. 2.19 State transition. Mechanismus, který rostlině umožňuje reagovat na měnící se podmínky ozářenosti přesunem části anténních komplexů LHC II mezi fotosystémy I a II (Převzato z Mullineaux & Emlyn-Jones, 2005).

Při vysoké ozářenosti se rostlina snaží chránit před fotoinhibičními procesy. Jedním ze způsobů ochrany je tzv. xantofylový cyklus, při kterém dochází k záměně jednotlivých karotenoidů ve fotosystémech, konkrétně se violaxantin mění na zeaxantin. Zeaxantin je schopen měnit energii, které je při stresu z nadměrného ozáření v buňce příliš, na teplo, čímž buňku před příliš velkým množstvím energie chrání (Dekker & Boekema, 2005; Jahns *et al.*, 2009).

Nadměrná ozářenost vede, v rámci fotoinhibičních procesů, k porušení proteinu D1 v PSII (Mulo *et al.*, 2008). Rostliny si vybudovaly mechanismus, který umožňuje snadnější opravu tohoto proteinu pomocí změny velikosti gran. Při stresu nadměrným ozářením dochází u huseničku (*Arabidopsis thaliana* L.) ke smršťování gran (Obr. 2.20), tedy zmenšování jejich průměru, což vede ke zvýšení mobility proteinů v granech a také

usnadňuje cestu poškozeného PSII do intergranálních thylakoidů, kde se dochází k jeho reparaci (Herbstova *et al.*, 2012).



Obr. 2.20 Obrázek shrnuje změny v architektuře thylakoidů při vysoké ozáření. Mezera mezi jednotlivými thylakoidy v granu je úzká, aby mohlo docházet k pohybu enzymu FtsH proteáza a ribozomů. Při zvýšené ozáření dochází k částečnému laterálnímu rozvolnění gran a tím ke zvýšení mobility proteinů poškozeného PSII. Díky tomu, může dojít k přesunu proteinů na membrány intergranálních thylakoidů a jejich opravě (Převzato z Herbstova *et al.*, 2012).

Nejen grana, ale také samotné thylakoidy a jejich velikost, jsou ovlivněny různou ozářeností. Tým H. Kirchhoff (2011) demonstroval u huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.) světelně indukovaný nárůst vnitřního prostoru granálních thylakoidů až o 96%. Širší lumen thylakoidů znamená větší prostor pro difuzi proteinů, zejména plastocyaninu a také pro pohyb D1 proteinu v membránách při jeho reparačních procesech. Při vyšší ozáření také dochází k přesunu části LHC II od PS II v granech k PS I na intergranálních thylakoidech v rámci procesu state transition, jak bylo popsáno výše. Vzhledem k tomu, že anténní komplexy LHC II a jejich vazby jsou hlavní silou stabilizující grana (Dekker & Boekema, 2005), je možné, že rozšiřování lumen thylakoidů je důsledkem přesunu LHC II mimo ně. V *in vivo* podmínkách zatím nebylo zjištěno, že by došlo k úplnému rozvolnění gran při procesu state transition. Vždy se jednalo pouze o změnu uspořádání na okrajích membrán, která se pohybovala v rozmezí 10 – 20% (Rozak *et al.*, 2002; Mustardy & Garab, 2003; Shimoni *et al.*, 2005). Tvrzení, že při vyšší ozáření dochází k rozšíření lumen thylakoidů, odporuje předchozím představám získaným na izolovaných thylakoidech, které naopak tvrdí, že při

vyšší ozáření dochází ke zúžení vnitřního prostoru thylakoidů (Chow *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2008).

2.3.3 Změny v ultrastruktuře chloroplastů při zvýšené koncentraci CO₂ a vliv dalších faktorů

Ultrastruktura chloroplastu je silně ovlivněna mnoha vnějšími (podmínky prostředí či denní doba) i vnitřními (stáří listu) faktory (Griffin *et al.*, 2001; Rozak *et al.*, 2002; Kivimaenpaa *et al.*, 2003; Zellnig *et al.*, 2004) Jedním z významných vnějších faktorů je také koncentrace CO₂ v atmosféře.

Při pěstování několika druhů C₃ rostlin při EC byl zjištěn nárůst poměru intergranálních thylakoidů ku granálním thylakoidům (Griffin *et al.*, 2001). Autoři si to vysvětlují tím, že rostliny kompenzují zvýšenou dostupnost CO₂ nárůstem množství intergranálních thylakoidů, aby mohly účinněji fixovat CO₂ do cukerných molekul. Pro kvantifikaci struktur použili autoři stereologické metody.

Stejný trend – vyšší poměr intergranálních thylakoidů ku granálním thylakoidům pozorovali autoři Teng *et al.* (2006) u huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.). Souhlasí s tvrzením autorů (Griffin *et al.*, 2001), že důvodem pro vyšší poměr intergranálních thylakoidů ku granálním thylakoidům je dostupnost většího množství CO₂, tedy i více energie a rychlejší růst rostliny. Důvodem může podle (Teng *et al.*, 2006) být přítomnost velkých škrobových zrn, která zabírají větší objem chloroplastu, kde tak již nezbývá místo na grana. Důsledkem nárůstu škrobových zrn je také nárůst šířky chloroplastů, aniž by se změnila jejich délka.

Nárůst počtu a velikosti škrobových zrn byl zjištěn také u dvou kultivarů sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) jež byly pěstovány při EC (Hao *et al.*, 2012).

U huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.) pěstovaného při zvýšené koncentraci CO₂ (700 μmol mol⁻¹) došlo také k nárůstu počtu chloroplastů v mezofylové buňce v porovnání s rostlinami pěstovanými při atmosférické koncentraci CO₂ (370 μmol mol⁻¹) (Teng *et al.*, 2006).

Větší počet i šířku chloroplastů pozorovali také autoři (Wang *et al.*, 2004) u tabáku (*Nicotiana glauca* L.) při kultivaci zvýšené koncentraci CO₂ (730 μmol mol⁻¹) oproti rostlinám pěstovaným při atmosférické koncentraci CO₂ (365 μmol mol⁻¹).

Protože v reálných podmínkách dochází vždy k působení více faktorů dohromady, zabývají se kombinací více faktorů i některé experimentální studie.

Vlivem kombinace dvou faktorů – zvýšené koncentrace CO₂ (560 ppm) a zvýšené koncentrace O₃ se zabývali autoři (Oksanen *et al.*, 2001). Studovali dva rostlinné druhy, osiku (*Populus tremuloides* L.) a břízu (*Betula papyrifera* L.), které byly ošetřovány CO₂ a O₃ po dobu tří let. Zjistili mimo jiné, že druhy reagují na změny vnějších podmínek odlišně. U osiky pozorovali při zvýšené koncentraci O₃ nárůst počtu plastoglobulů v chloroplastech, zatímco při ošetření EC došlo k jeho poklesu. Současně došlo u rostlin pěstovaných při zvýšené koncentraci O₃ ke snížení množství škrobu, na rozdíl od rostlin, které byly ošetřeny kombinací zvýšené koncentrace obou faktorů, u nichž se obsah škrobu v chloroplastech zvýšil. Ošetření rostlin zvýšenou koncentrací O₃ vedlo ke změnám uspořádání thylakoidů, konkrétně docházelo k častějším dilatacím a deformacím thylakoidních membrán. Bříza reagovala na zmíněná ošetření méně citlivě. I přes to autoři pozorovali nárůst plastoglobulů při zvýšené koncentraci O₃ a také nárůst velikosti škrobových zrn v chloroplastech při EC (Oksanen *et al.*, 2005). Zvýšenou koncentrací O₃ indukované změny thylakoidních membrán byly zmírněny EC.

Ke stejným změnám v ultrastruktuře chloroplastů jako při kultivaci ve zvýšené koncentraci O₃ – např. snížení množství škrobu, zvýšená akumulace plastoglobulů - dochází také u rostlin vystavených různým stresovým podmínkám či u senescentních rostlin (Olmos *et al.*, 2007).

Změny v uspořádání thylakoidních membrán i celého membránového systému jsou také častým průvodním projevem při vystavení rostlin různým stresovým podmínkám. V následujících odstavcích uvádím několik příkladů změn ultrastruktury chloroplastů stresovaných rostlin. Některé změny v ultrastruktuře mohou být podobné těm, které vyvolává EC.

Při vystavení rostlin stresu suchem byl u rostliny lilku (*Solanum melongena* L.) pozorován nižší počet chloroplastů v buňce (Fu *et al.*, 2013). Je to opačná reakce, než rostliny vykazují při pěstování při EC (Teng *et al.*, 2006). Chloroplasty v rostlinách pěstovaných ve stresu suchem získaly také kulatější tvar (Fu *et al.*, 2013), stejně jako chloroplasty rostlin pěstovaných při EC (Teng *et al.*, 2006). Nárůst pozorovali autoři v množství thylakoidních

membrán u stresovaných rostlin borovice (*Pinus sylvestris* L.) (Zellnig *et al.*, 2010) a také u špenátu (*Spinacia oleracea* L.) (Zellnig *et al.*, 2004). Membrány byly ale u stresovaných rostlin nepravidelně uspořádané v porovnání s kontrolními rostlinami (Fu *et al.*, 2013).

Dilataci thylakoidních membrán v chloroplastech planiky obecné (*Arbutus unedo* L.) pozorovali také autoři (Navarro *et al.*, 2007) u rostlin rostoucích v zasoleném prostředí. Také u nich došlo ke zvýšení počtu plastoglobulů v chloroplastech oproti kontrolním rostlinám.

Stresovými faktory pro rostliny jsou i extrémní teploty jak vysoké, tak nízké. Při vysokých teplotách dochází např. u pšenice (*Triticum aestivum* L.) k bobtnání thylakoidů a narůstání objemu vnitřního prostoru thylakoidů (Xu *et al.*, 1995). Podobné změny v ultrastruktuře chloroplastů sledovali také (Kreslavski *et al.*, 2008) u stejného druhu - nabobtnalé thylakoidní membrány, u nichž docházelo k rozvolňování a úbytek gran v chloroplastech při porovnání s kontrolními i rostlinami. Také (Chen *et al.*, 2012) pozorovali změny v ultrastruktuře chloroplastů tentokrát u rostlin cedrátu (*Citrus medica* L.) - vakuolizace a separace thylakoidních membrán. Při teplotě vyšší než 45°C se vyskytovaly v buňce deformované chloroplasty, které měly nabobtnalý tvar a neobsahovaly žádné thylakoidní membrány.

Úbytek membrán a jejich bobtnání pozorovali autoři (Stefanowska *et al.*, 2002) při vystavení rostlin řepky olejky (*Brassica napus* L.) teplotě -5° C po dobu 18 ti hodin.

Společným znakem rostlin stresovaných extrémními teplotami, ať už vysokými či nízkými, jsou výběžky chloroplastů.

Výběžky chloroplastů byly nalezeny u několika druhů rostlin. Délka výběžků se pohybuje v rozmezí 3-5 μm (Bourett *et al.*, 1999; Holzinger *et al.*, 2007) a obsahují pouze stroma, žádné thylakoidní membrány ani organely. Vyskytují se u rostlin jako adaptace na život v nízkých teplotách, nadmořská výška patrně nemá na vývoj výběžků vliv. Jejich funkcí je zvětšit plochu membrány pro efektivnější transport iontů a cukrů mezi chloroplasty a cytoplazmou. Výběžky často sousedí s jinými organelami - mitochondrie, peroxisomy, aby lépe dosáhly požadavků zvýšené fotorespirace (Lutz & Engel, 2007).

Výběžky byly sledovány také jako adaptace u rostlin při kultivaci ve vysokých teplotách (25° C a více), při porovnání s rostlinami rostoucími v teplotách 5°C - 15°C. Se vzrůstající teplotou také docházelo k prodlužování výběžků. Výběžky nejsou artefaktem, protože byly pozorovány jak u vzorků chemicky fixovaných, tak i u vzorků zpracovaných metodou vysokotlakého zmrazování a mrazové substituce (Bourett *et al.*, 1999; Holzinger *et al.*, 2007).

V literatuře někdy dochází k záměně výběžků se stromuly (Holzinger *et al.*, 2007). Tyto dvě struktury vyskytující u chloroplastů jsou však odlišné v mnoha znacích (Lutz & Engel, 2007). Liší se zejména velikostí, stromuly mají velikost více jak 20µm, na rozdíl od výběžků, které jsou dlouhé 3-5 µm (Bourett *et al.*, 1999; Holzinger *et al.*, 2007). Stromuly se také často tvoří v místech, kde jsou chloroplasty daleko od sebe, což není u výběžků obvyklé a vyskytují se hlavně u nezelených plastidů. V chloroplastech byly pozorovány jen výjimečně (Holzinger *et al.*, 2007).

Při sledování reakce rostlin na výskyt těžkých kovů v zálivce byly pozorovány dva hlavní znaky, které se opakovaly u více rostlinných druhů. Chloroplasty obsahovaly větší množství škrobu (Alkhatib *et al.*, 2012; Reboredo, 2012; Saco *et al.*, 2013) stejně jako u rostlin vystavených EC (Teng *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2012). Druhým znakem byly nabobtnalé a dezorganizované thylakoidy (Saco *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014) což odpovídá reakci rostlin na různé typy stresů, mezi které těžké kovy patří.

2.4 Gradienty anatomických parametrů v rámci čepele listu

Anatomické gradienty závisí nejen na postavení listu na jedné rostlině, ale objevují se také v rámci jednoho listu (Pazourek, 1966). Studium nejen anatomických, ale i fyziologických gradientů v rámci čepele listu se vědci zabývají již od 60. let minulého století. U rostlin tabáku (*Nicotiana glauca* L.) byly sledovány tyto parametry: hustota a velikost průduchů a intenzita transpirace, fotosyntézy a dýchání. U všech parametrů, kromě velikosti průduchů, bylo zjištěno, že ve směru od báze k apikální části listu, stejně tak od středu k okraji listu, dochází k jejich snižování (Slavík, 1963). Podle (Pazourek, 1966), který se zabýval hustotou průduchů na čepeli listu barvínku (*Vinca minor* L.), závisí rozmístění průduchů více na struktuře žilnatiny. V místech, kde se nachází žilky, nedochází k distribuci průduchů a naopak (Pazourek, 1966).

3. MATERIÁL A METODY

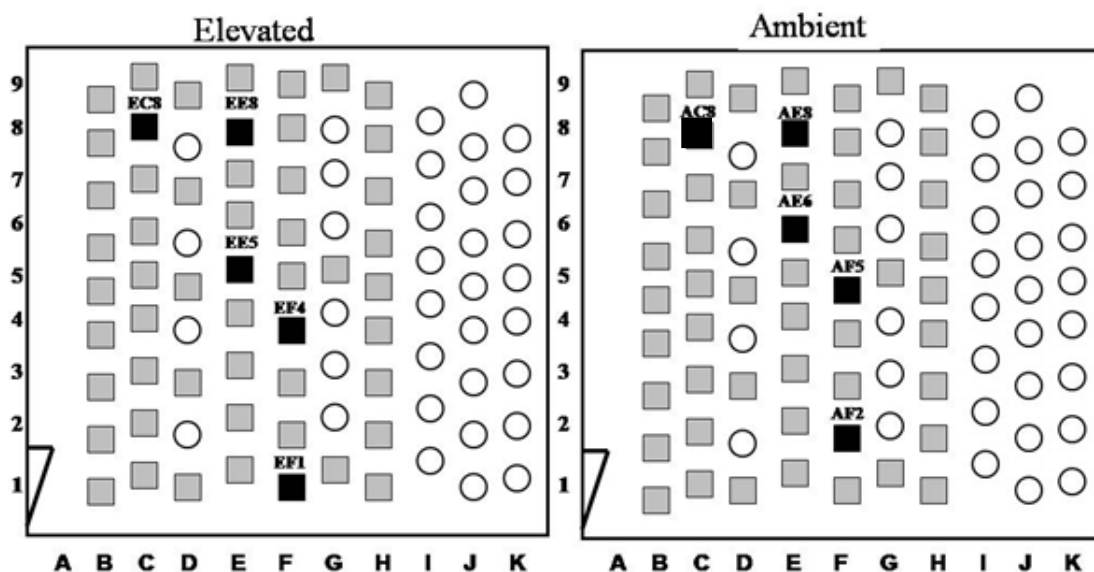
3.1 Odběr vzorků listoví

Vzorky listů buku byly odebírány na experimentální ekologické stanici Bílý Kříž Laboratoře ekologické fyziologie rostlin Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i. Bílý Kříž se nachází v Moravskoslezských Beskydech (49°30' s.š., 18°32' v.d.; 908 m. n. m.) (Lhotakova *et al.*, 2012).

Buky byly pěstovány ve dvou kultivačních sférách při dané koncentraci CO₂. Kultivační sféry mají rozlohu 10x10 m, v centrální části jejich výška dosahuje 7m (Obr. 3.2). Konstrukce je tvořena železným rámem, v němž jsou ukotvena automaticky otevíratelná skleněná okna. Díky tomuto systému dochází k co nejnižší spotřebě CO₂ a zároveň je umožněno dosáhnout takové podmínky, které co nejlépe odpovídají přirozeným podmínkám v okolí. Teplota a vzdušná vlhkost jsou srovnatelné s vnějšími podmínkami. Největší vliv komor na porost je spojen s procházejícím slunečním zářením, které je redukováno o 26 % oproti podmínkám mimo sféry. V jedné sféře se udržuje atmosférická koncentrace CO₂, která se v letech 2005 – 2012 pohybovala v rozmezí od 382 ppm do 395 ppm¹. Ve druhé sféře dosahuje hodnota koncentrace CO₂ 700 ppm (Urban *et al.*, 2001). Ošetření EC bylo aplikováno kontinuálně od konce dubna do října, v souladu s růstovou sezónou v této oblasti.

Buky byly do sfér přesazeny roku 2005 jako pětileté stromy. Společně s nimi se zde pěstují i smrky, jedná se tedy o smíšený smrkovo-bukový porost. Testované stromy byly vybrány jako reprezentativní jedinci (stromy bez poškození), jednak rostoucí mezi buky, ale také v sousedství smrků. Rozmístění stromů ve sférách je vidět na obr. 3.1.

¹ (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/graph.html>)



Obr. 3.1 Rozmístění stromů ve sférách. Vlevo – sféra se zvýšenou koncentrací CO₂ (Elevated), Vpravo – sféra s atmosférickou koncentrací CO₂ (Ambient), buk lesní ■ smrk ztepilý ○. Označení stromů - např. EC5: E – zvýšená koncentrace CO₂ (Elevated), C – 3. řada stromů, 5 – 5. strom od začátku řady

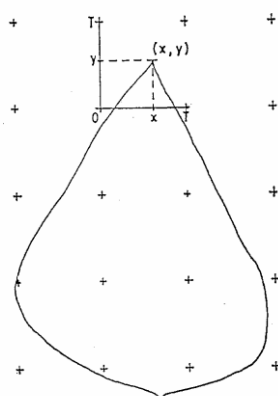
Vzorky byly odebrány 30. června roku 2010. Pocházely z 5 stromů pěstovaných při AC a z 5 stromů ze sféry s EC. Z každého stromu byl odebrán vždy jeden slunný a jeden stinný list z jižní strany, ze kterého byly připraveny segmenty pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM), bližší popis v kapitole 3.2.



Obr. 3.2 Kultivační sféry na experimentálním ekologickém stanovišti Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech (Převzato z: <http://www.czechglobe.cz/>).

3.2 Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Za účelem vyhodnocení vlivu ozářenosti a EC na ultrastrukturu chloroplastů byly použity vždy segmenty o velikosti přibližně 1x2 mm ze střední části listu, mimo hlavní žilnatinu. Cílem práce bylo též vyhodnotit, zda střední část listu je reprezentativní pro kvantitativní hodnocení ultrastruktury chloroplastů. Bylo tedy potřeba zohlednit možnost gradientů ve sledovaných parametrech v rámci listu. Na slunných listech pěstovaných při atmosférické koncentraci CO₂ bylo tak odebráno navíc 5 segmentů v souladu s principem systematicky rovnoměrně náhodného výběru (SUR) (Obr. 3.3).



Obr. 3.3 Systematicky rovnoměrně náhodný výběr segmentů na bifaciálním listu. Nejprve je na základě velikosti listu zvolena systematická bodová mřížka pro výběr segmentů tak, aby z každého listu bylo odebráno alespoň 5 segmentů. U větších slunných listů byla vzdálenost mezi segmenty stanovena na $T=19$ mm. Čísla x a y jsou vybrána náhodně z množiny čísel $\{0,1,\dots,T-1\}$ a určují náhodné souřadnice, do kterých je umístěn apex listu. Systematický rovnoměrně náhodný výběr segmentů je zajištěn jejich vybráním v pozicích odpovídajících bodové mřížce. Listové segmenty jsou řezány, jak je uvedeno na obrázku (Převzato z Kubinova, 1993).

Segmenty byly z listů odebrány v laboratoři v Praze, kam byly celé listy převezeny v chladu a temnu. Segmenty byly fixovány ve směsi 5% glutaraldehydu v 0,1M fosfátovém pufru a dále odvodněny a převedeny do pryskyřice Spurr v automatickém mikrovlnném procesoru (Leica EM AMW, Leica Microsystem, Vídeň, Rakousko).

Postup pro přípravu vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) byl následující: fixace (5% GA), promytí puftrem, postfixace (2% OsO₄), opět promytí puftrem, odvodnění v acetonu, infiltrace a zalití do media (viz protokol níže – Tab. 3.1). Tento postup lze provádět i ručně, je to však velmi časově náročné. Díky využití automatického zpracování vzorků v mikrovlnném procesoru byl celý proces přípravy zkrácen ze 3 dnů na cca 1,5 hodiny. Pouze vlastní zalití do media bylo provedeno ručně s připojením označení vzorku na papírku

do pryžové formy s možností orientace. V termostatu byly vzorky zpolymerovány při teplotě 65°C a po vychladnutí byly hotové vzorky nakrájeny.

Protokol TEM - Leica EM AMW (mikrovlnný procesor)

ampulka	krok (opakování)	čas (min)	max. teplota (°C)	čínidlo	režim záření	max. výkon záření (Watt)
1	1	3	37	Pufr + GA	kont.	15
1	2	3	20	Pufr + GA	kont.	0
1	3	3	37	Pufr + GA	kont.	15
1	4	3	20	Pufr + GA	kont.	0
2	1	3	37	Pufr	svah	20
3	1	2	37	Pufr	puls	15
4	1	2	37	Pufr	svah	20
5	1	12	37	Pufr +OsO4	kont.	15
6	1	2	37	Pufr	kont.	15
7	1	2	37	Pufr	kont.	15
8	1	2	37	Aceton 30%	kont.	15
9	1	2	37	Aceton 50%	svah	20
10	1	2	37	Aceton 75% + uranyl acetát	svah	20
11	1	2	37	Aceton 75%	svah	20
12	1	2	37	Aceton 90%	svah	20
13	1	4	37	Aceton 100%	svah	20
14	1	4	37	Aceton 100%	svah	20
15	1	9	37	Aceton : Spurr (9:1)	kont.	10
16	1	6	37	Aceton : Spurr (3:1)	kont.	10
17	1	6	40	Aceton : Spurr (1:1)	kont.	10
18	1	6	45	Aceton : Spurr (1:3)	kont.	10
19	1	6	50	Spurr	kont.	12
20	1	6	50	Spurr	kont.	12

Tab. 3.1 Protokol použitý při zpracování vzorků v mikrovlnném procesu. Režim záření: kont. = rychlý nárůst teploty a poté udržení nastavené teploty, svah = jemný nárůst teploty v průběhu nastaveného času, puls = rychlý nárůst teploty, dokud není dosažena nastavená teplota, záření vypnuto, dokud teplota neklesne o 5°C, záření zapnuto, aby bylo opět dosaženo požadované teploty, GA – glycerinaldehyd.

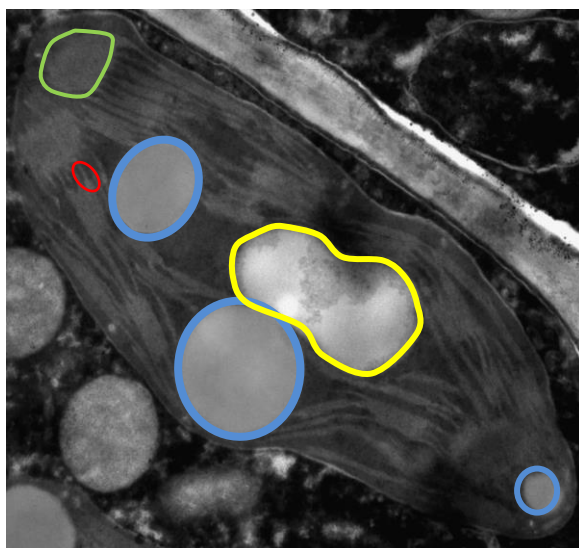
Protože příprava ultratenkých řezů je náročná na technickou zručnost a vyžaduje praxi, byla provedena na objednávku v Laboratoři biologie buněčného jádra Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. Řezy o tloušťce asi 70 nm byly řezány na ultramikrotomu (Leica EM UC7, Leica Microsystem, Vídeň, Rakousko) diamantovým nožem (sklon 45°, Diatome, Biel, Švýcarsko). Vzorky byly přeneseny na měděné sítky potažené formvarem,

s hustotou ok 300. Vzorky byly pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu TEM JEOL – JEM – 1011 (JEOL, Tokyo, Japonsko) v Laboratoři elektronové mikroskopie PŘF UK. Obraz byl snímán CCD kamerou Veleta s použitím akvizičního softwaru Olympus (Olympus, Soft Imaging Solution GmbH, Münster, Německo) s rozlišením 2048 x 2048. Chloroplasty byly snímány při zvětšení 20-25 tisíc, tak aby chloroplast zaujímal co největší plochu zorného pole a byla umožněna co nejvyšší přesnost měření bez nutnosti obrázky skládat.

Z každého segmentu listu byly nasnímány 4 mediální řezy chloroplastem. Byl vybrán vždy jeden mediální řez z několika následujících buněk v první vrstvě palisádového parenchymu v blízkosti pokožky. Dále byly určeny vybrané strukturální parametry za použití stereologických metod.

3.3 Stanovení vybraných strukturálních parametrů chloroplastů pomocí stereologických metod

Pro charakterizaci ultrastruktury chloroplastů buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) jsem zvolila tyto parametry: plochu mediálního řezu chloroplastem, která může přibližně vypovídat o velikosti chloroplastu, a poměrná zastoupení jednotlivých struktur v tomto mediálním řezu (thylakoidní membrány, plastoglobuly a škrobová zrna) (Obr. 3.4.). Plocha mediálního řezu chloroplastu je uváděna v μm^2 a poměrné zastoupení jednotlivých struktur je uváděno v procentech celkové plochy mediálního řezu chloroplastem.

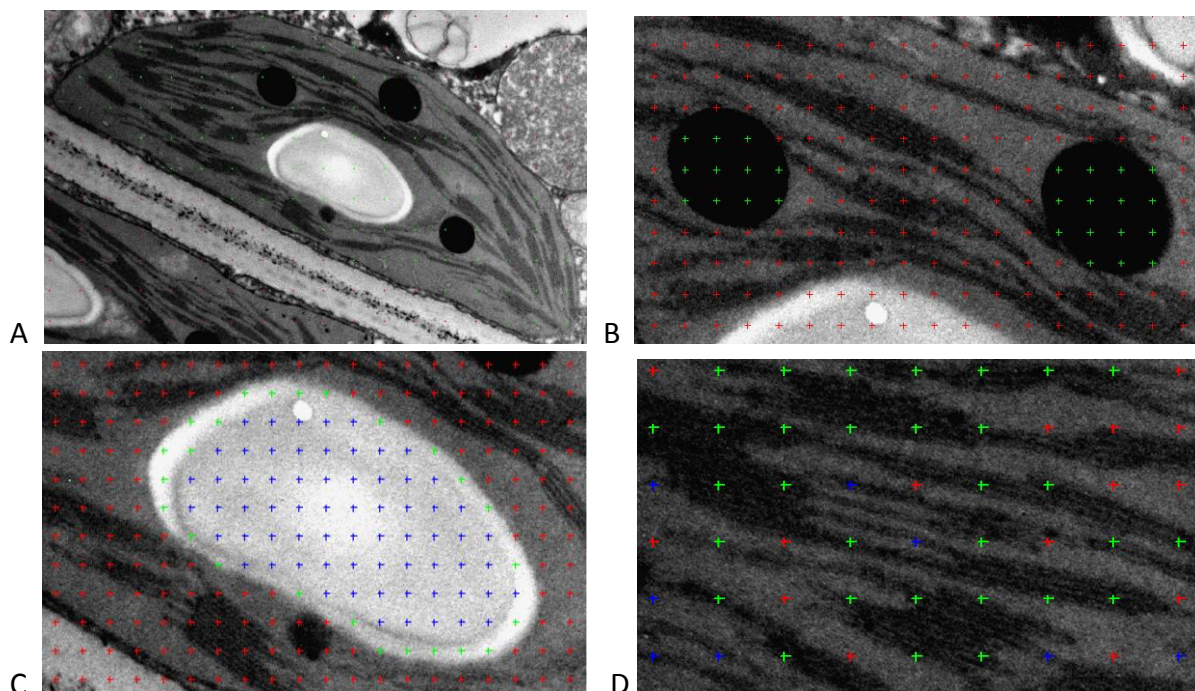


Obr. 3.4 Vybrané struktury měřené na mediálním řezu chloroplastem. Modré označení – plastoglobuly, žluté označení – škrobové zrna, zelené označení – granum, červené označení – intergranální thylakoid.

3.3.1 Aplikace bodové metody v programu Ellipse

Na měření vybraných parametrů jsem použila bodovou metodu. Princip této metody je detailně popsán v kapitole 2.2.1.1.1.

Dříve (Kutik *et al.*, 1999; 2004) se měření provádělo příkládáním průsvitných plastových fólií se stereologickou mřížkou, která měla pravidelně uspořádané body, na mikrofotografii chloroplastu. Já jsem využila software Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovensko), konkrétně plugin vícenásobné mřížky (PointGrid MultiForegroundGrid neboli PG Mfg) (Obr. 3.5). Tento modul nabízí možnost měřit až tři různé parametry na 1 mřížce. Tuto funkci jsem využila v případě měření granálních a intergranálních thylakoidů (Obr. 3.5. D) a škrobových zrn (Obr. 3.5.C).



Obr. 3.5 Použití vícenásobné mřížky na měření ultrastrukturálních parametrů chloroplastu. (A) Plocha chloroplastu – červené křížky: zásah mimo měřenou oblast, zelené křížky: zásah do chloroplastu, (B) plastoglobuly – červené křížky: zásah mimo měřenou oblast, zelené křížky: zásah do plastoglobulu, (C) škrobové zrna – červené křížky: zásah mimo měřenou oblast, zelené křížky: zásah do metabolicky aktivního škrobu, modré křížky: zásah do škrobového zrna, (D) thylakoidní membrány – červené křížky: zásah mimo měřenou oblast, zelené křížky: zásah do granálních thylakoidů, modré křížky: zásah do intergranálních thylakoidů.

3.4 Statistické metody

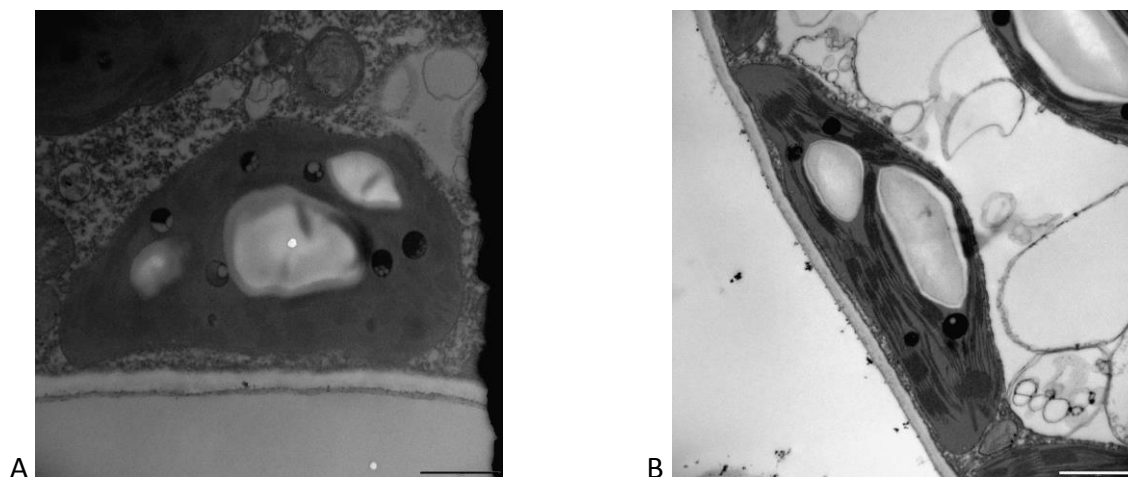
Statistické vyhodnocení vlivu ozáření a EC na ultrastrukturu chloroplastů bylo provedeno v programu NCSS 2000 (NCSS, USA). Rozdílnost dat byla vyhodnocována analýzou rozptylu dvojného třídění (two way ANOVA – repeated measures), která zohledňuje závislost pozorování – fakt, že slunný a stinný list byl odebrán vždy ze stejného stromu.

Statistické vyhodnocení výsledků porovnávání hodnot ze střední části listu a ostatních pěti poloh bylo provedeno v programu NCSS 2000 (NCSS, USA) dvouvýběrovým t-testem.

4. VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace řezu pro kvantitativní vyhodnocení

Kvalita mikrofotografií z transmisního elektronového mikroskopu (TEM) se může mezi jednotlivými mikrofotografiemi velmi lišit. Aby mohl být obrázek použit na měření, musí být jednotlivé struktury dobře viditelné a jejich hranice dobře rozeznatelné s dostatečným kontrastem od pozadí. Tento předpoklad je důležitý zejména u kvantifikace thylakoidních membrán (Obr. 4.1).

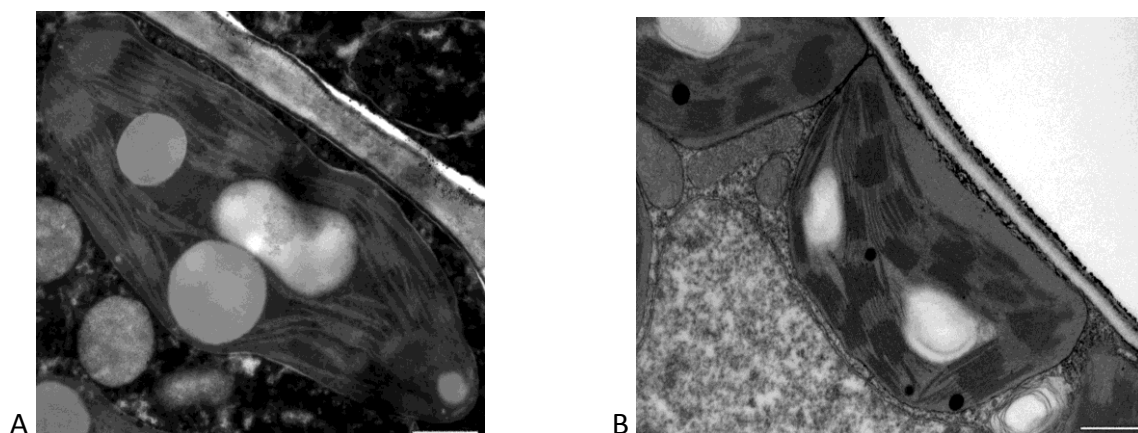


Obr. 4.1. (A) znázorňuje mikrofotografii chloroplastu z transmisního elektronového mikroskopu (TEM), která nemá nedostatečnou kvalitu a kontrast. Tato mikrofotografie není vhodná pro kvantifikaci strukturních parametrů, zejména thylakoidních membrán. (B) je naopak mikrofotografie chloroplastu z transmisního elektronového mikroskopu (TEM), jejíž kontrast je dostačující a která je vhodná pro kvantifikaci strukturních parametrů chloroplastu. Úsečka znázorňuje v obou případech délku 1 μ m.

Jedním z faktorů, které ovlivňují kvalitu mikrofotografií, je i její kontrast. Kontrast mikrofotografie závisí primárně na hustotě a tloušťce jednotlivých struktur na řezu. Kromě

toho, je kontrast také ovlivněn typem a množstvím kontrastní látky, počtem vazebných míst pro kontrastní látku na dané struktuře, či pH kontrastní látky (Hayat, 1970). Existují dva typy kontrastu. Prvním z nich je kontrast pozitivní, kdy dochází ke zbarvení právě požadovaných struktur a jsou tedy na mikrofotografii tmavší než okolí (Obr. 4.2. B). Naopak při negativním kontrastu jsou dané struktury světlejší než okolí (Obr. 4.2. A). Při měření jsem se setkala s oběma typy kontrastů.

Negativní kontrast (membrány světlejší než okolí) znamená, že osmium zredukovalo dříve, než došlo k fixaci membrán, např. při styku s tanniny, a membrány tak zůstaly nezbarvené (Kutik *et al.*, 1981).



Obr. 4.2 Dva typy kontrastů, které je možno pozorovat na mikrofotografiích z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Negativní kontrast thylakoidních membrán a plastoglobulů (A) a pozitivní kontrast thylakoidních membrán a plastoglobulů (B). Úsečka v obou případech znázorňuje délku 1µm.

Před samotným měřením je nutné, aby se pozorovatel seznámil s charakterem obrázků. Rozpoznávání jednotlivých struktur na mikrofotografii není vždy jednoduché. V následujícím textu uvádím nejběžněji řešené problémové situace při měření jednotlivých struktur:

- Škrobová zrna

Škrobová zrna nejsou celistvá a jsou dvoubarevná. Při fixaci vzorku se osmium (OsO_4) zastaví na hranici škrobového zrna a dále neproniká, proto je škrobové zrno ohraničeno tmavou barvou. Okolo škrobového zrna je viditelný tzv. „dvůrek“, světlejší oblast, která pravděpodobně představuje metabolicky aktivní škrob spolu s enzymy, které se podílejí na vzniku či degradaci škrobu (J. Nebesářová, ústní sdělení). (Obr. 4.3 A, B). Při kvantifikaci škrobových zrn jsem vyhodnocovala jak plochu samotného zrna, tak i zrna s dvůrkem.

- Intergranální thylakoidy

Další problematická situace je vidět na obr. 4.4 A, B. Při pozorování a snaze o kvantifikaci membránového systému zde není zcela jasné, zda se jedná o jeden intergranální thylakoid, nebo jsou to dva thylakoidy uloženy vedle sebe. Dva thylakoidy nad sebou již jsem započítala jako granum.

- Orientace gran

Většina gran je v chloroplastu zpravidla orientována rovnoběžně s obalovou membránou chloroplastu. Stejnou orientaci vykazují na převážné části mikrofotografií také na mediálním řezu. Došlo tedy k jejich říznutí v kolmém směru. V některých případech (Obr. 4.5 A, B) mají grana ale orientaci nepravidelnou. Domnívám se, že je to způsobeno jejich říznutím v jiném než kolmém směru. Tento fakt v mnoha případech výrazně ztěžuje odlišení přesné hranice gran a stromatu, stejně tak činí problematické rozhodnutí mezi granálním a intergranálním thylakoidem.

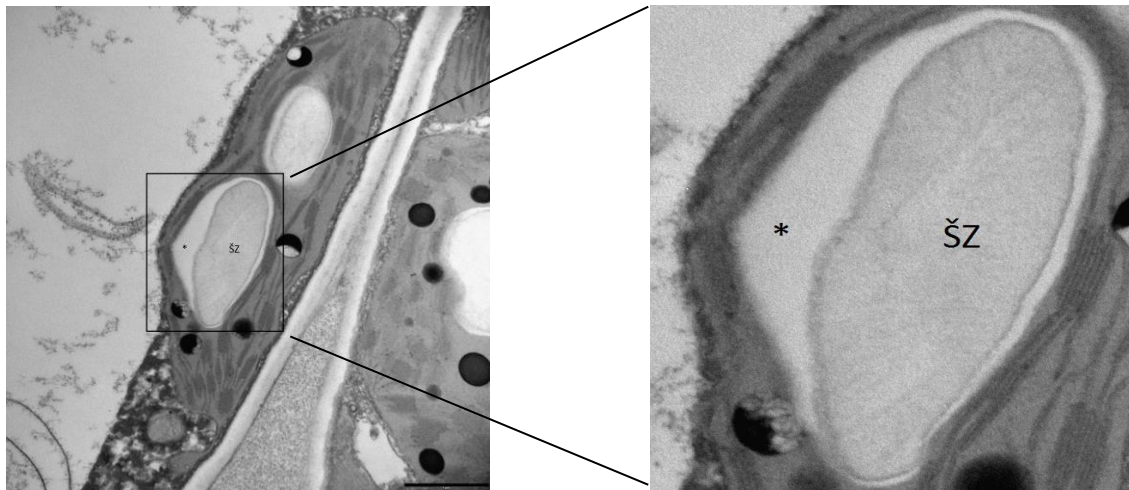
- Jiné membránové struktury: „bubliny“ a váčky

Na některých mikrofotografiích jsou v chloroplastu zřetelné membránou ohraničené struktury připomínající „bubliny“ a váčky. V nastudované literatuře jsem se nesešla s popisem podobných struktur, domnívám se tedy, že se tyto membránové struktury či váčky mohou oddělovat od vnitřní membrány chloroplastu a komunikovat s thylakoidním systémem. Rozhodla jsem se je tedy započítat mezi intergranální thylakoidy (Obr. 4.6 A, B). Tyto membránové struktury nikdy nezaujímaly velkou plochu, nepředpokládám tedy, že by jejich přiřazení k intergranálním thylakoidům výrazně ovlivnilo výsledky.

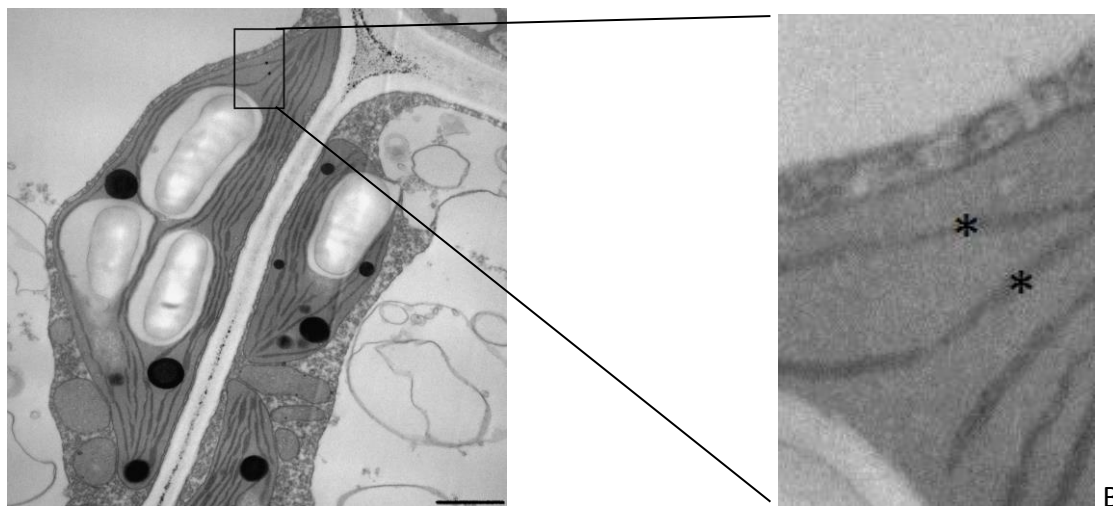
Vzhledem k výše popsaným problémovým situacím je zřejmé, že zaučení pozorovatele do rozpoznávání struktur a jejich měření je poměrně časově náročné. Výsledné hodnoty se tak liší u stejného pozorovatele v době před a po zaučení. Je nezbytně nutné věnovat dostatečný čas tomu, aby pozorovatel získal potřebnou praxi a zkušenosti a jeho výsledky se mohly považovat za relevantní a srovnatelné s výsledky jiných zkušených pozorovatelů. Nezbytnost řádného zaučení pozorovatele jsem ověřovala následujícím pokusem.

Tento experiment spočíval ve vyhodnocení sledovaných parametrů na deseti chloroplastech čtyřmi různými pozorovateli, kteří neměli v měření potřebnou praxi, byli jen

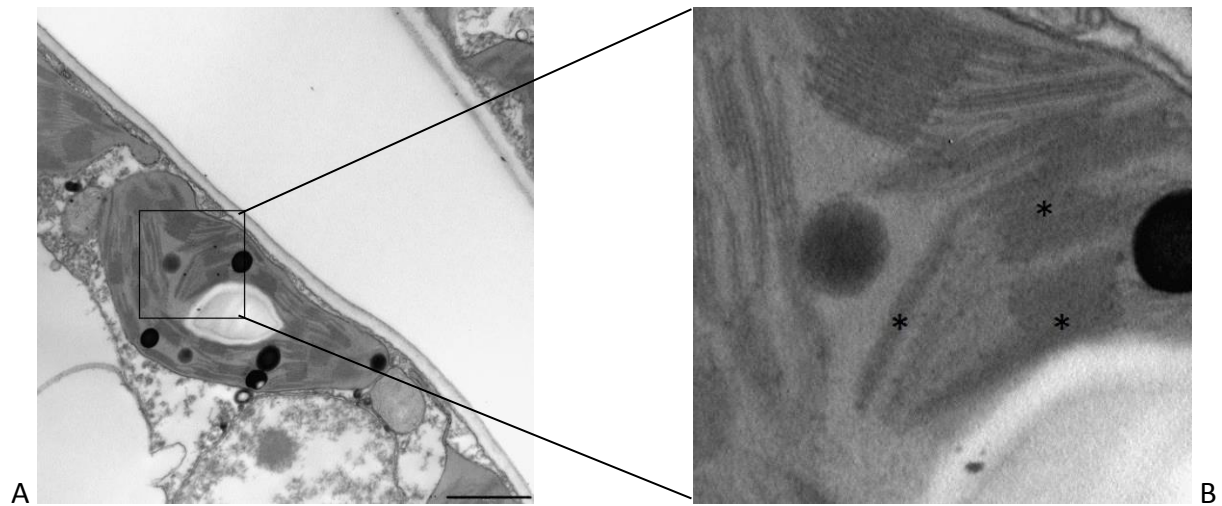
nezbytně poučení o sledovaných strukturách a principech používání bodové metody. Hodnoty takto získaných parametrů se porovnávaly s výsledky, ke kterým společně dospěli tři zkušení pozorovatelé (Anna Vrbová a konzultantky Dr. Barbora Radochová a Dr. Zuzana Lhotáková). Výsledky nejsou uvedeny v této práci.



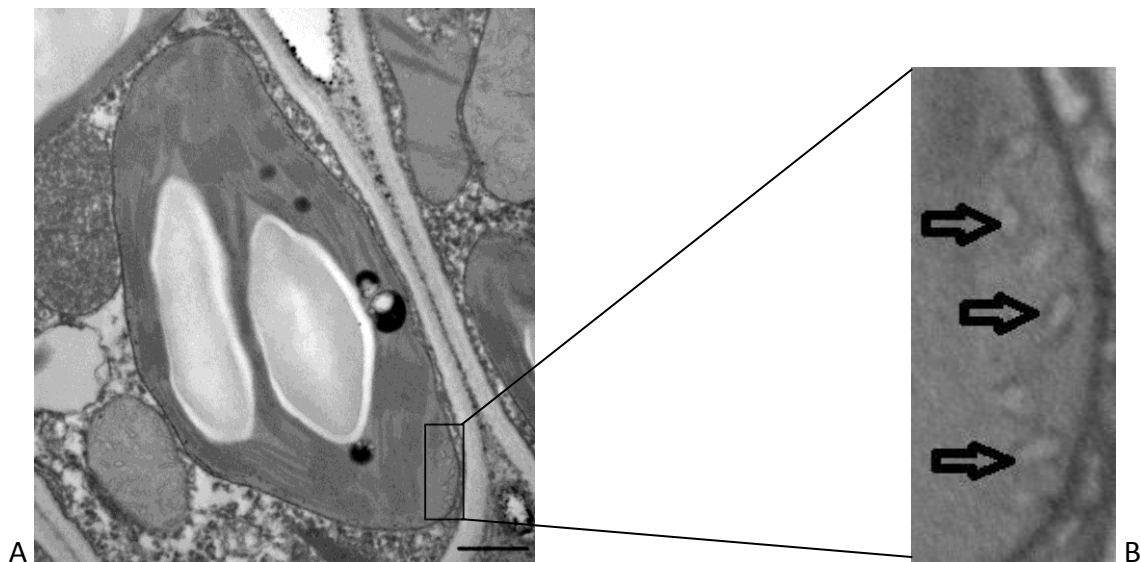
Obr. 4.3 Mediální řez chloroplastem listu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). (A) znázorňuje škrobové zrno (šz) spolu s oblastí dvůrku (*). Úsečka znázorňuje délku 1 μ m. (B) detail vyznačené oblasti na (A) znázorňuje škrobové zrno (šz) spolu s oblastí metabolicky aktivního škrobu (*).



Obr. 4.4 Mediální řez chloroplastem listu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). (A) znázorňuje nejasné oblasti jednoho či dvou thylakoidů (*). Úsečka znázorňuje délku 1 μ m. (B) detail vyznačené oblasti na (A) znázorňuje nejasnou oblast jednoho či dvou thylakoidů (*).



Obr. 4.5 Mediální řez chloroplastem listu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). (A) znázorňuje nepravidelně orientovaná grana (*). Úsečka znázorňuje délku 1 μ m. (B) detail vyznačené oblasti na (A) znázorňuje nepravidelně orientovaná grana (*).



Obr. 4.6 Mediální řez chloroplastem listu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). (A) znázorňuje jiné membránové struktury „bubliny a váčky“. Úsečka znázorňuje délku 1 μ m. (B) detail vyznačené oblasti na (A) znázorňuje jiné membránové struktury „bubliny a váčky“ (označené šipkami).

4.2 Vyhodnocení změn v ultrastruktuře chloroplastů buku lesního pod vlivem zvýšené koncentrace CO₂ a různé ozáření

Následující text shrnuje výsledky získané při vyhodnocování změn v ultrastruktuře chloroplastů pod vlivem EC a různé ozáření.

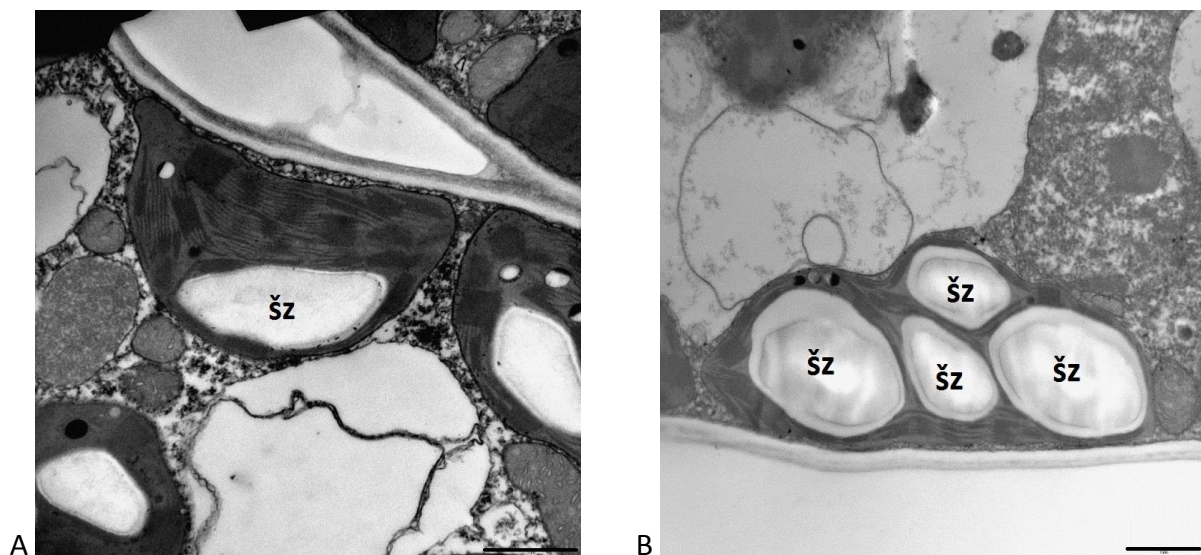
Na velikost plochy mediálního řezu chloroplastem neměl vliv ani jeden ze sledovaných faktorů - koncentrace CO₂ a ozáření (Graf 4.1). Chloroplasty listů buku

pěstovaného při zvýšené koncentraci CO₂ (EC) měly vyšší podíl škrobu na ploše mediálního řezu a to u slunných i stinných listů (Graf 4.2, Obr. 4.7). U chloroplastů ošetřených EC byl pozorován trend zvětšování škrobových zrn, avšak jejich počet se v závislosti na koncentraci CO₂ neměnil (Grafy 4.3 a 4.4).

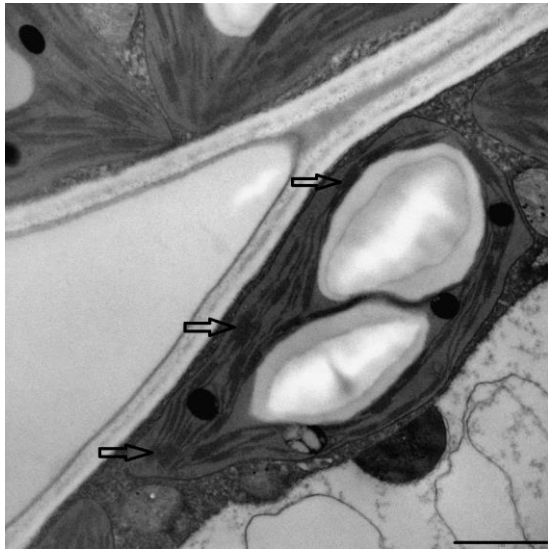
Prokázalo se, že uspořádání membrán se mění pod vlivem ozáření i EC: vyšší podíl granálních thylakoidů (GT) byl pozorován u stinných chloroplastů bez ohledu na koncentraci CO₂ (Obr. 4.8), chloroplasty stromů z EC vykazovaly trend nižšího podílu gran (Graf 4.6). Podíl intergranálních thylakoidů (IGT) byl průkazně ovlivněn jak koncentrací CO₂ tak ozáření: vyšší podíl IGT byl shledán u chloroplastů stromů pěstovaných v atmosférické koncentraci CO₂ a u stinných listů (Graf 4.7). Vzájemný poměr GT/IGT vzrostl při EC (Graf 4.8).

U podílu plastoglobulů byl pozorován trend ke zvyšování při EC a u slunných listů (Graf 4.9, Obr. 4.9).

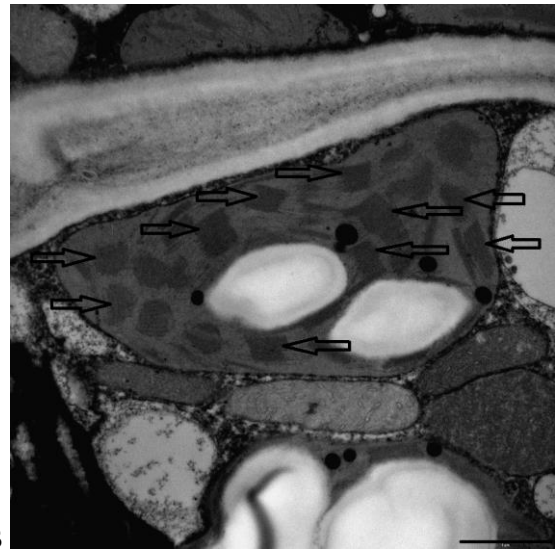
Na grafu 4.5 je srovnání hodnot škrobového zrna bez dvůrku a s dvůrkem (viz definice „dvůrku“ v podkapitole 4.1). Plocha škrobového zrna s dvůrkem je větší, než plocha samotného škrobového zrna. Nebyl prokázán statisticky významný vliv EC, ani ozáření na velikost plochy škrobového zrna, s dvůrkem, nebo bez dvůrku.



Obr. 4.7 Mediální řez chloroplastem listu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu (TEM) šz – škrobové zrna. (A) Chloroplasty stromů rostoucích v atmosférické koncentraci CO₂, (B) Chloroplasty stromů rostoucích ve zvýšené koncentraci CO₂, (šz) škrobové zrna. Úsečky znázorňují délku 1 μm.

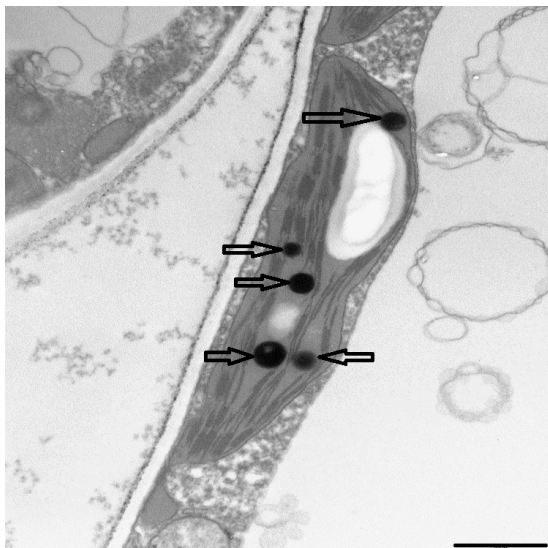


A

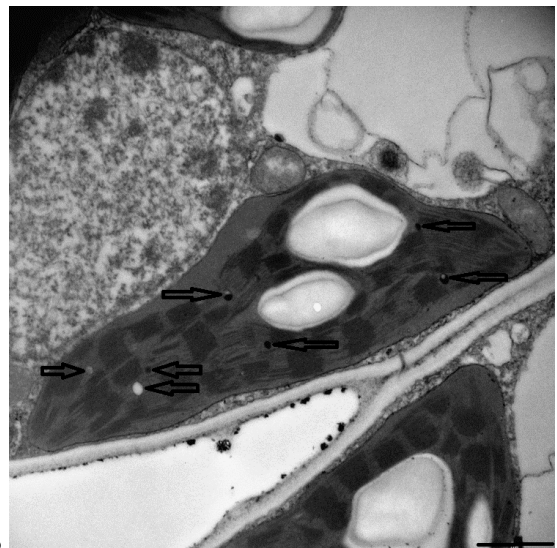


B

Obr. 4.8 Mediální řez chloroplastem listu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Grana jsou označená šipkami. (A) slunný chloroplast, (B) stinný chloroplast. Úsečky znázorňují délku 1 μm .

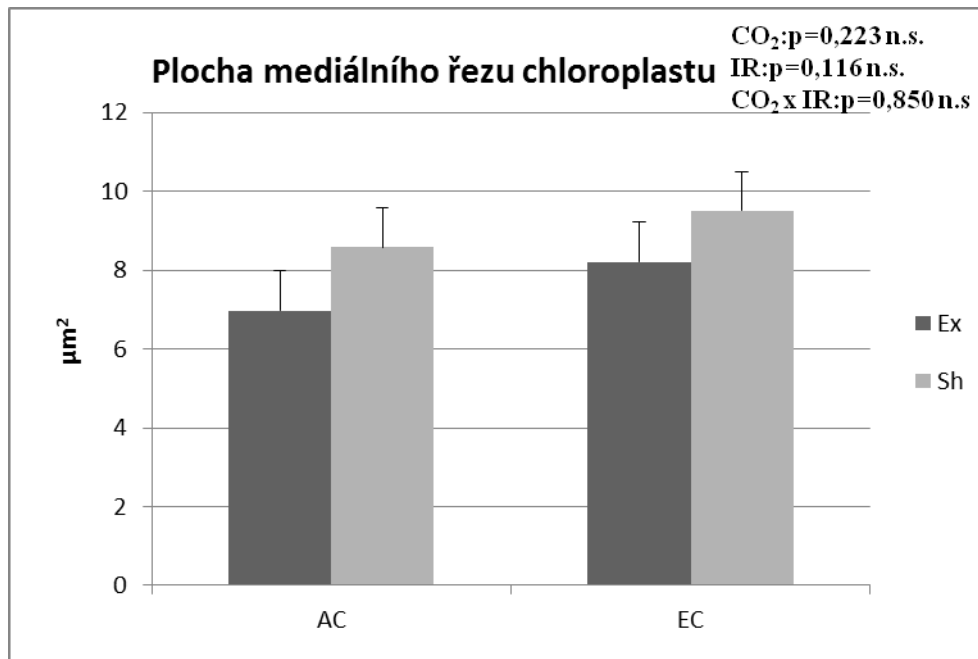


A

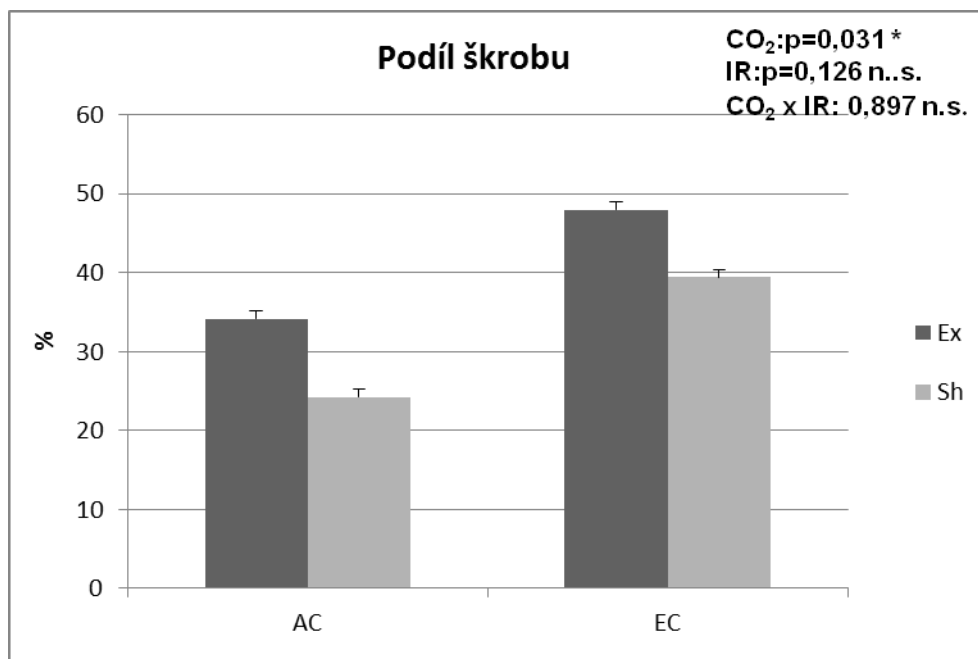


B

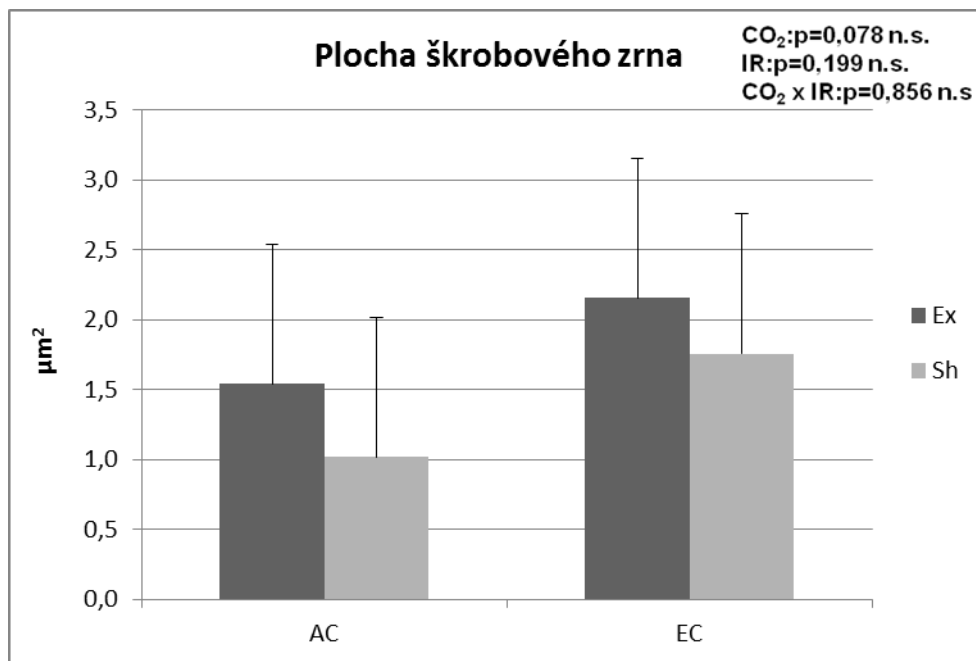
Obr. 4.9 Mediální řez chloroplastem listu buku lesního z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Plastoglobuly jsou označené šipkami. (A) slunný chloroplast, (B) stinný chloroplast. Úsečky znázorňují délku 1 μm .



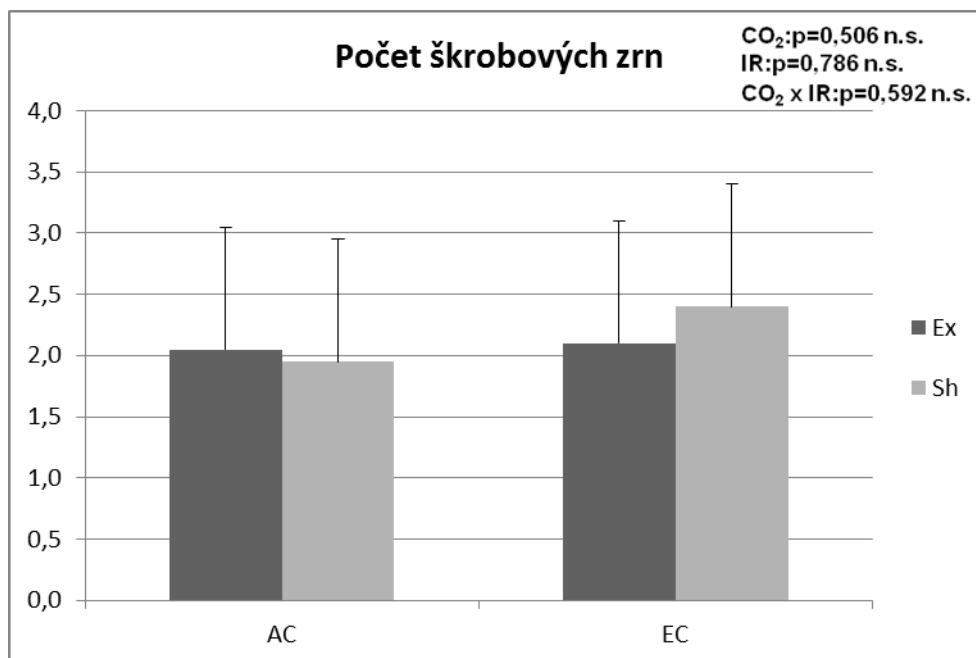
Graf 4.1 Plocha mediálního řezu chloroplastu. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozáření (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. n.s. = neprůkazné.



Graf 4.2 Poměrné zastoupení škrobu v mediálním řezu chloroplastem. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozáření (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. *průkaznost na hladině p, n.s. = neprůkazné.

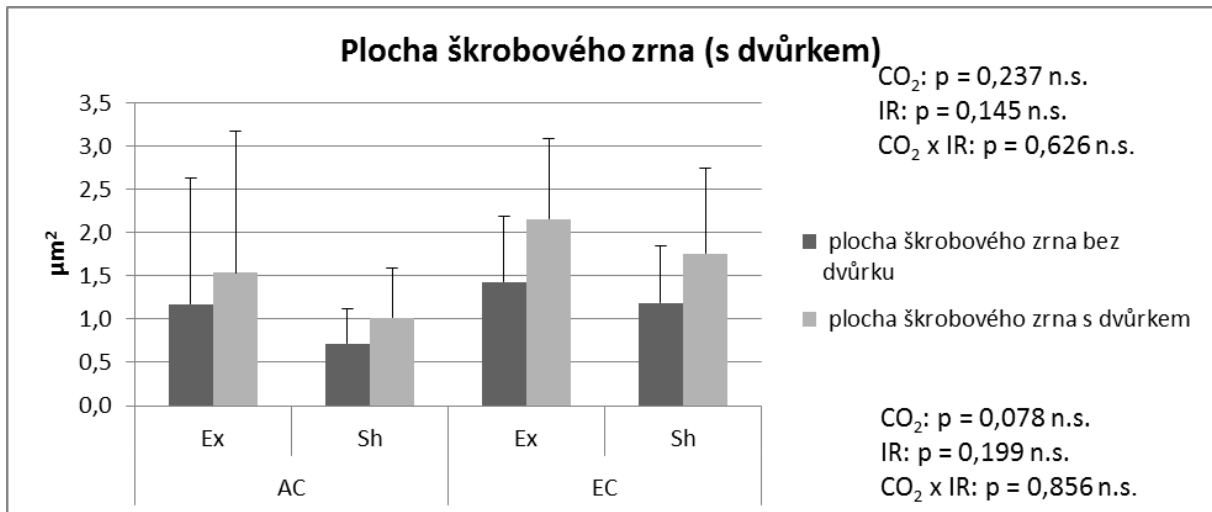


Graf 4.3 Plocha škrobového zrna v mediálním řezu chloroplastem. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozáření (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. n.s. = neprůkazné.

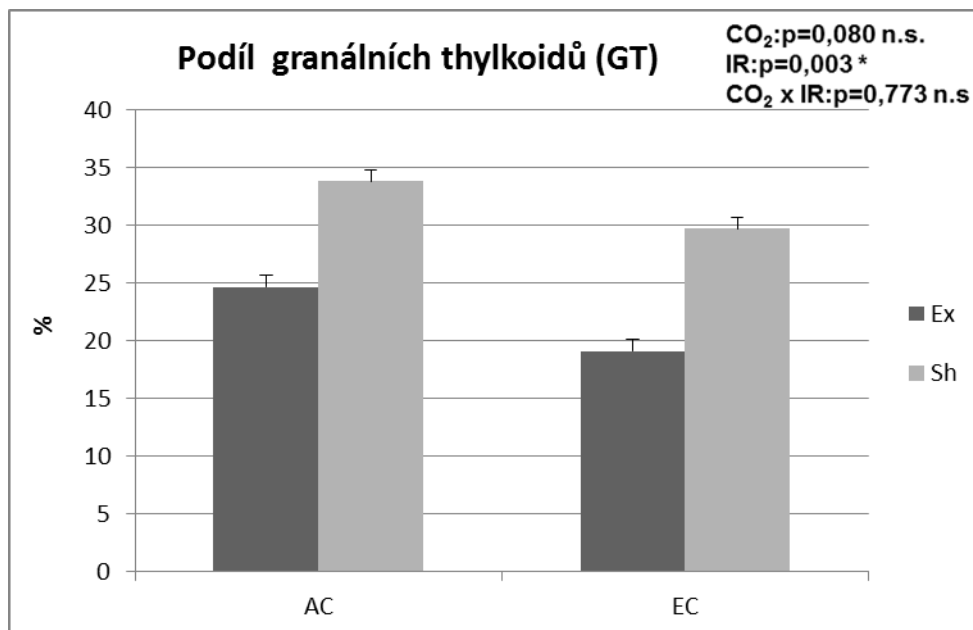


Graf 4.4 Počet škrobových zrn v mediálním řezu chloroplastem. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny

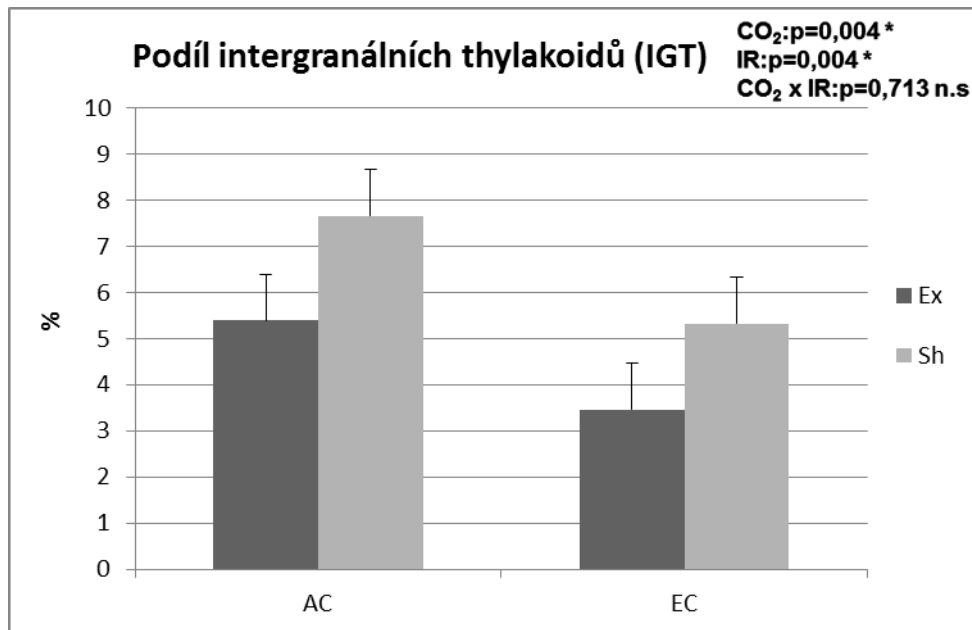
výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozáření (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. n.s. = neprůkazné.



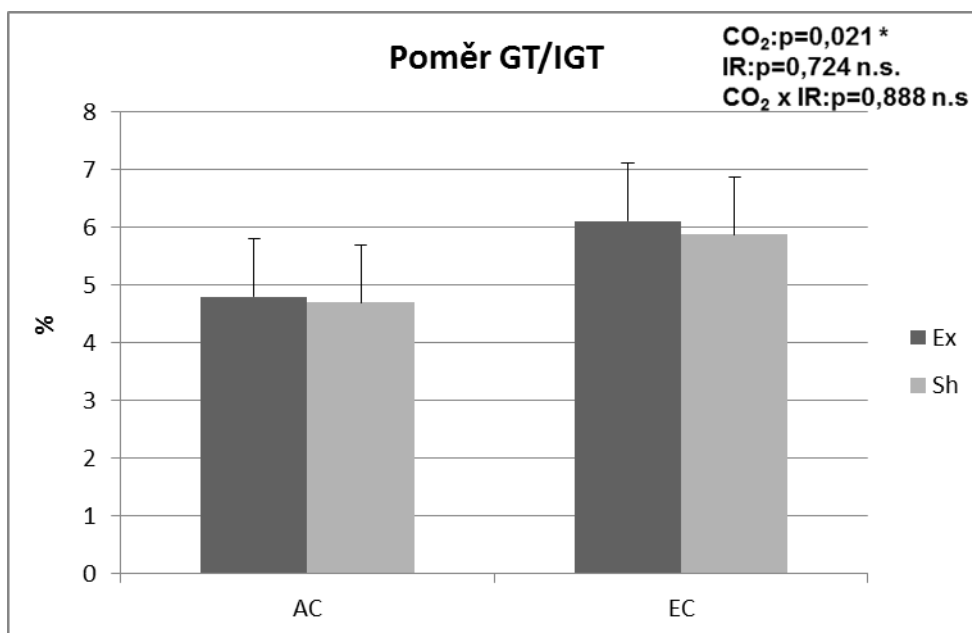
Graf 4.5 Plocha škrobového zrna s dvůrkem. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním a dolním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozáření (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. n.s. = neprůkazné.



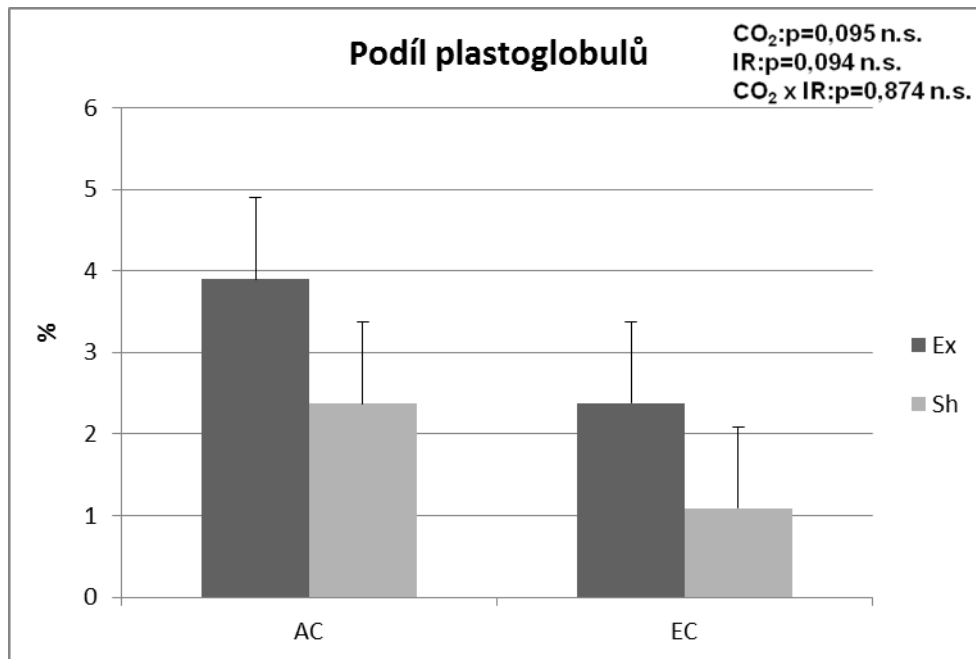
Graf 4.6 Poměrné zastoupení granálních thylakoidů (GT) v chloroplastu. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozáření (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. *průkaznost na hladině p, n.s. = neprůkazné.



Graf 4.7 Poměrné zastoupení intergranálních thylakoidů (IGT) v chloroplastu. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozářenosti (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. *průkaznost na hladině p, n.s. = neprůkazné.



Graf 4.8 Poměr granálních a intergranálních thylakoidů (GT/IGT) v chloroplastu. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozářenosti (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. *průkaznost na hladině p, n.s. = neprůkazné.



Graf 4.9 Poměrné zastoupení plastoglobulů v chloroplastu. AC – aktuální koncentrace CO₂, EC – zvýšená koncentrace CO₂, Ex – slunný list, Sh – stinný list. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (n=20), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcemi, efekt koncentrace CO₂, ozáření (IR) a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. n.s. = neprůkazné.

4.3 Variabilita ultrastruktury chloroplastů v rámci listu

Při získávání náhodných poloh na listu jsem si nejprve rozdělila list na tři části: apex, střed a báze. (Obr. 4.10). Po přiložení mřížky se můžeme setkat s dvěma různými situacemi, které jsou zobrazeny na obr. 4.11 A, B. Situace na obr. 4.11 A, kdy se překrývá poloha referenční s polohou ze středu vybranou systematicky rovnoměrně náhodným výběrem (SUR), nastává velmi zřídka. Naopak druhá situace (Obr. 4.11 B) je o mnoho častější, tzn. poloha vybraná pomocí SUR, která zasáhne střed je zpravidla na okraji listu a není totožná s referenční hodnotou ze středu listu.

Na základě vyhodnocení výsledků, zda kvantitativně vyjádřené parametry ultrastruktury chloroplastů ve střední části listu mohou být považovány za reprezentativní pro celou čepel listu, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl u těchto parametrů: plocha mediálního řezu chloroplastu (Graf 4.10), poměrné zastoupení škrobu (Graf 4.11), počet (Graf 4.12), a velikost škrobových zrn (Graf 4.13), ani poměrné zastoupení plastoglobulů v chloroplastu (Graf 4.14).

Naopak bylo zjištěno, že poměrné zastoupení granálních thylakoidů v chloroplastu je vyšší, pokud byl použit průměr z pěti vzorků odebraných z různých poloh na čepeli listu pomocí SUR (Graf 4.15). Poměrné zastoupení intergranálních thylakoidů se nelišilo (Graf 4.16), ale poměr GT/IGT byl opět vyšší pro průměr ze vzorků odebraných z různých poloh na čepeli listu (Graf 4.17) v důsledku vyššího poměrného zastoupení GT.

Rozdíl mezi výsledky získanými jen ze střední části listu a průměru z náhodně vybraných poloh u granálních thylakoidů na rozdíl od thylakoidů intergranálních může mít důvod v rozdílné přesnosti při měření.

Oby typy thylakoidů byly měřeny na stejně husté mřížce. U granálních thylakoidů bylo bezpečně splněno pravidlo, aby počet zásahů přesahoval stovku. U intergranálních thylakoidů, které jsou zejména u stinných listů méně hojné, bylo průsečíků méně (Tab. 4.1). Důvodem bylo jejich nízké zastoupení v chloroplastech. Vzhledem k této skutečnosti jsou získané výsledky týkající se intergranálních thylakoidů méně přesné a tím pádem je částečně zkreslený i poměr GT/IGT. Ze zaznamenaného rozdílu mezi střední částí listu a výsledkem získaným z průměru ploch vybraných systematickým rovnoměrně náhodným výběrem tedy není možné vyvodit významné závěry pro podíl intergranálních thylakoidů a poměr GT/IGT.

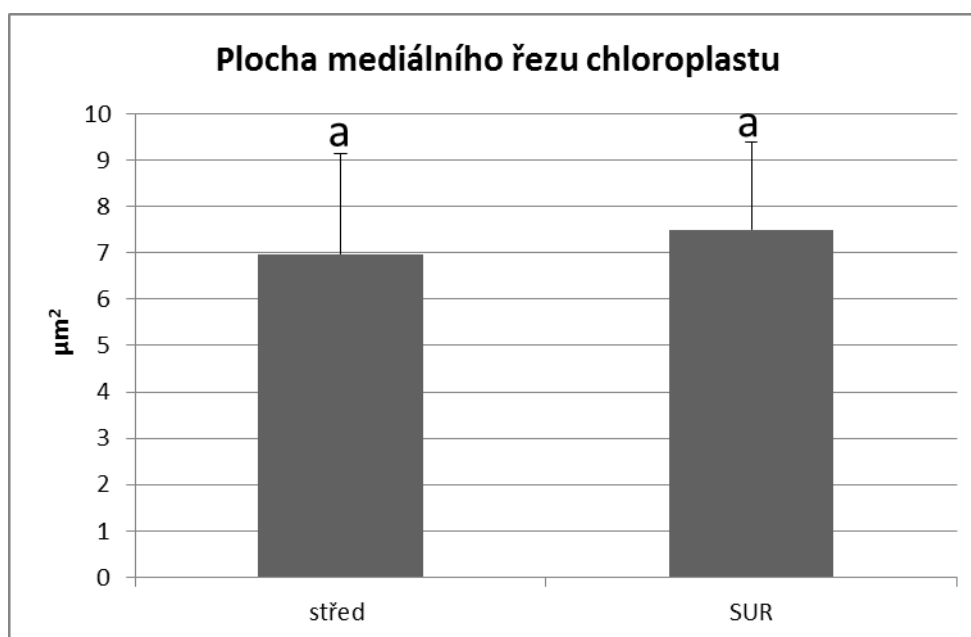
GT	IGT
160,0	30,2

Tab. 4.1 Průměrný počet zásahů do granálních (GT) a intergranálních (IGT) thylakoidů u slunných listů stromů pěstovaných při atmosférické koncentraci CO₂, n=100.

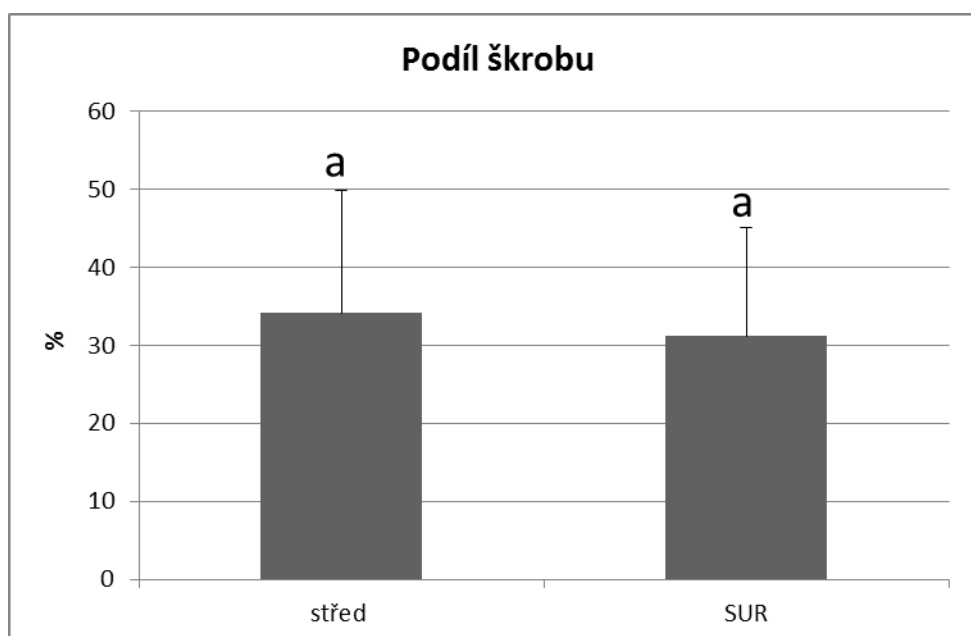
Dále se budu zabývat pouze poměrným zastoupením granálních thylakoidů v chloroplastu. Na grafu 4.18 je zobrazeno poměrné zastoupení granálních thylakoidů v chloroplastu v závislosti na poloze na čepeli listu. Z grafu 4.18 je vidět, že rozptyl hodnot je patrný u všech pozorovaných oblastí čepel listu. Relativně vyšší rozptyl byl pozorován na apexu listu A a překvapivě i ve střední části listu M, která bývá obvykle používána jako standardní místo odběru reprezentativní části čepel – poloha odběru segmentu blíže ke střední žilce u poloviny čepel listu. Zatímco u poloh B umístěných na bázi listu a případně u poloh S náhodně zvolené pozici v oblasti střední části listu byl rozptyl nejmenší, viz obr. 4.7.

Toto pozorování mě vedlo k provedení ještě další statistické analýzy, abych zjistila, zda je statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve střední části listu při výběru SUR a

referenční hodnotou ze středu listu (Graf 4.19). Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami získanými z referenční polohy ve středu listu (M) a z poloh vybraných SUR.

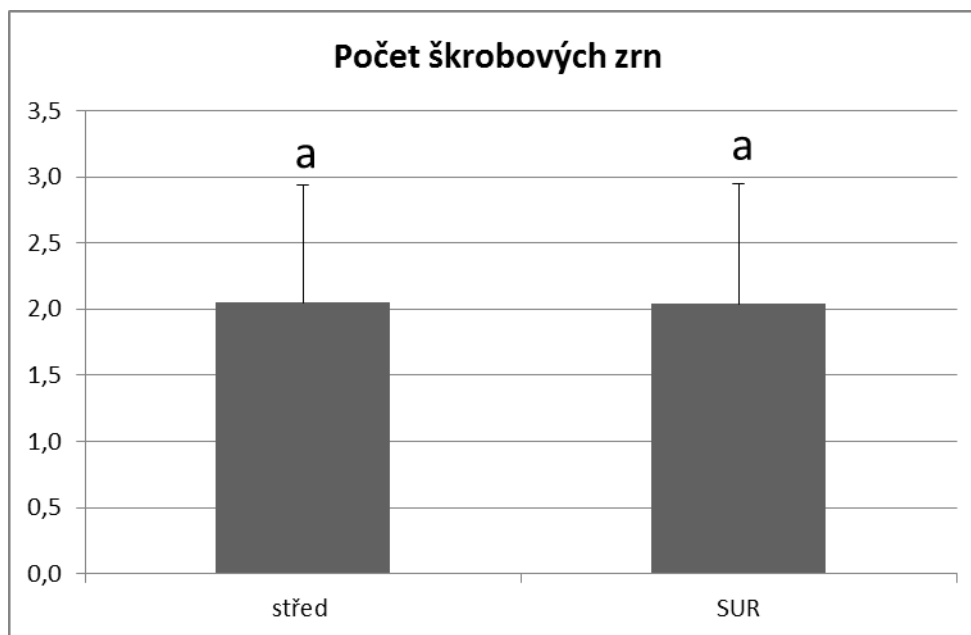


Graf 4.10 Plocha mediálního řezu chloroplastu. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR: n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.

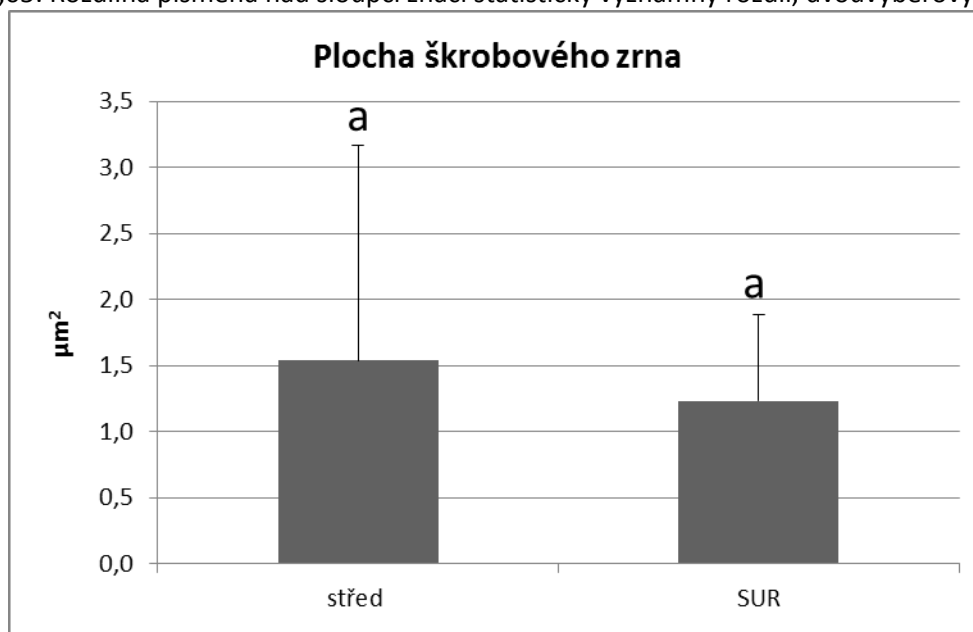


Graf 4.11 Poměrné zastoupení škrobu na mediálním řezu chloroplastem. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR:

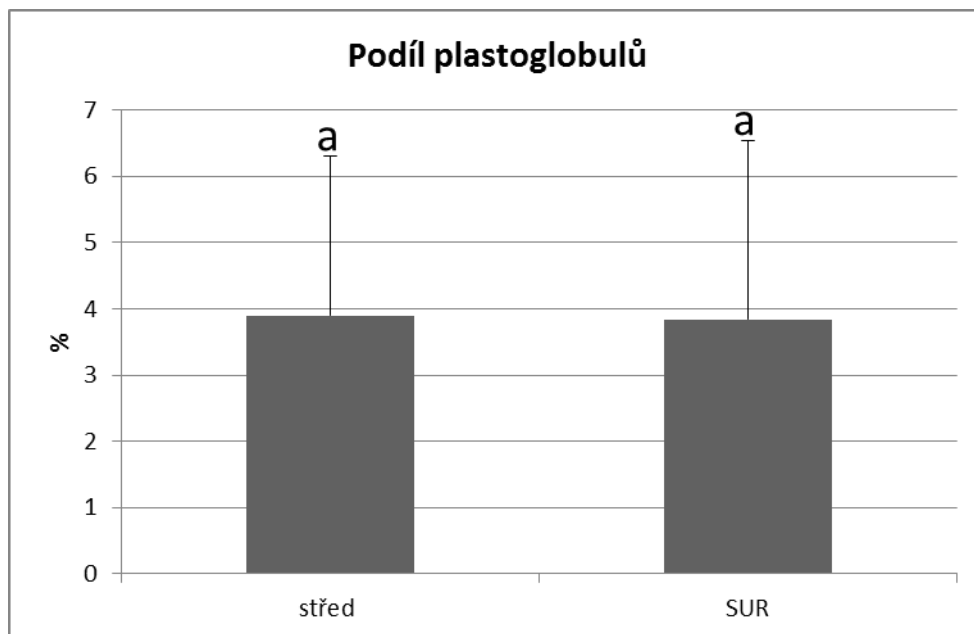
n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



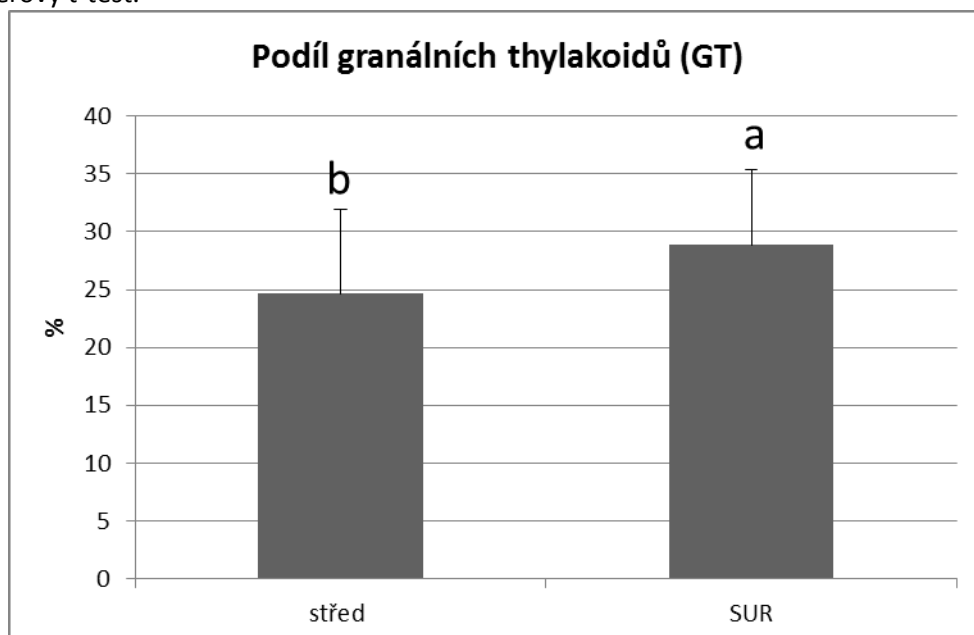
Graf 4.12 Počet škrobových zrn na mediálním řezu chloroplastem. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR: n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



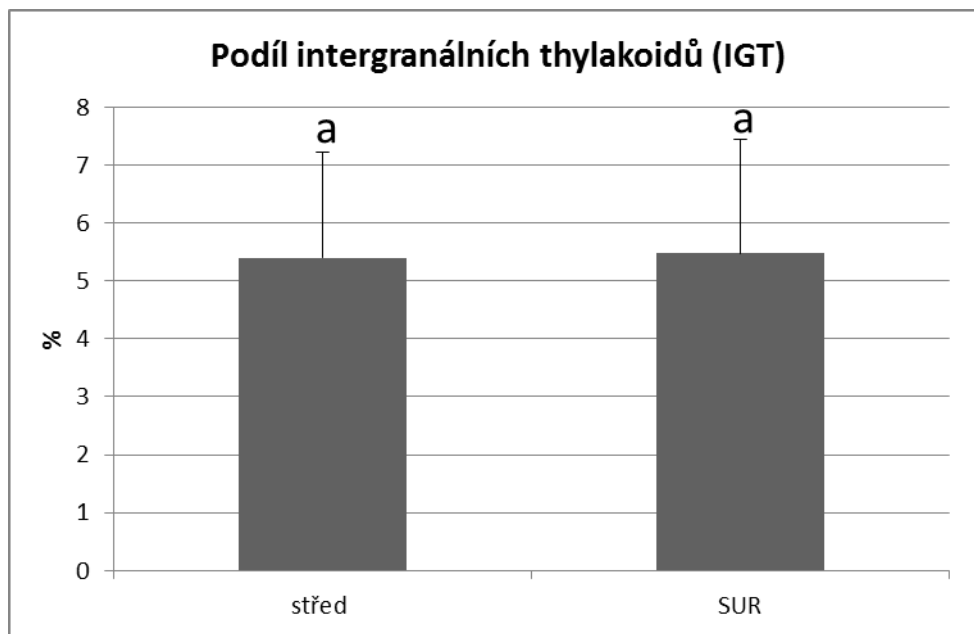
Graf 4.13 Plocha škrobového zrna na mediálním řezu chloroplastem. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR: n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



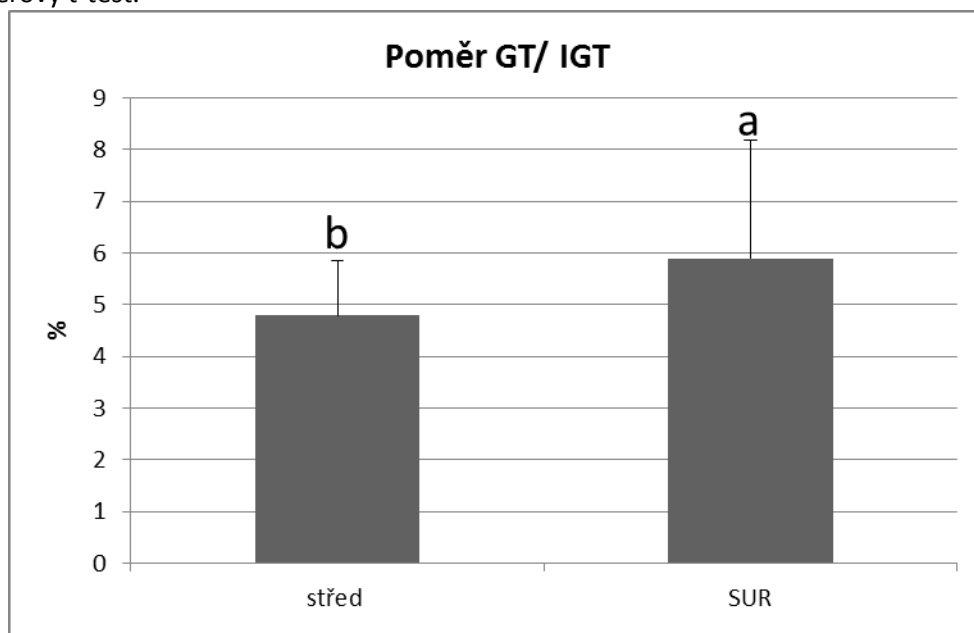
Graf 4.14 Poměrné zastoupení plastoglobulů na mediálním řezu chloroplastem. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR: n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



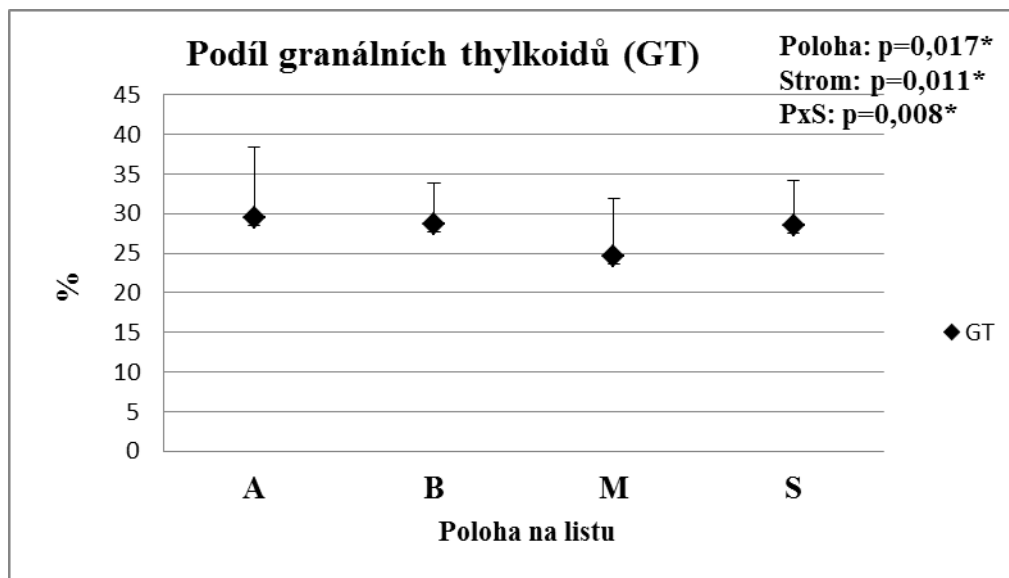
Graf 4.15 Poměrné zastoupení granálních thylakoidů (GT) v chloroplastu. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR: n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



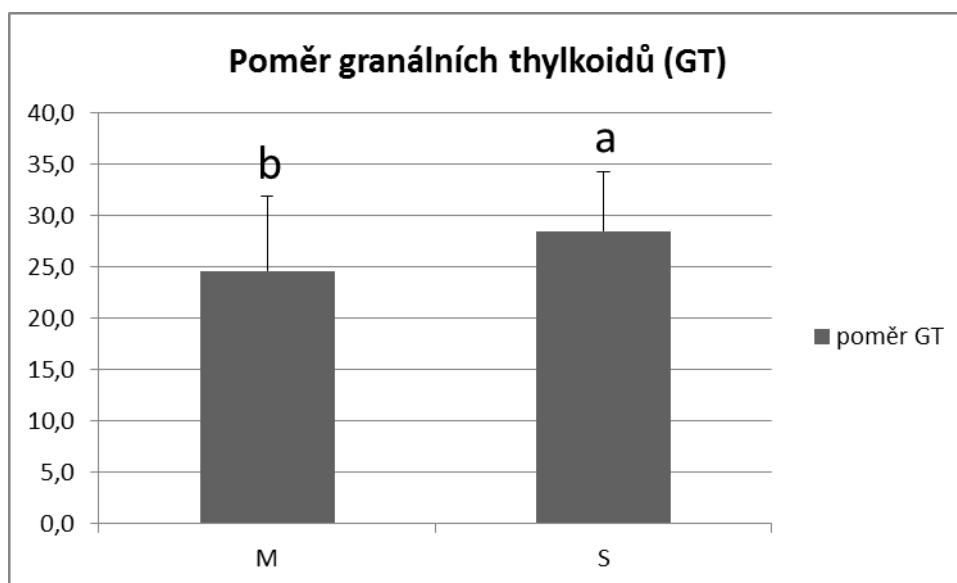
Graf 4.16 Poměrné zastoupení intergranálních thylakoidů (IGT) v chloroplastu. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR: n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



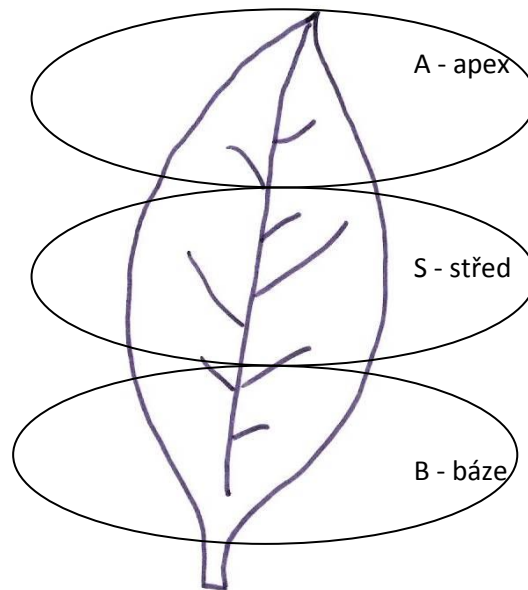
Graf 4.17 Poměr granálních a intergranálních thylakoidů (GT/IGT) v chloroplastu. Střed – vzorek odebraný ze střední části listu, mimo střední žilku, SUR – výsledky získané z alespoň pěti poloh na listu vybraných systematicky rovnoměrně náhodně. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (střed: n=20, SUR: n=100), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



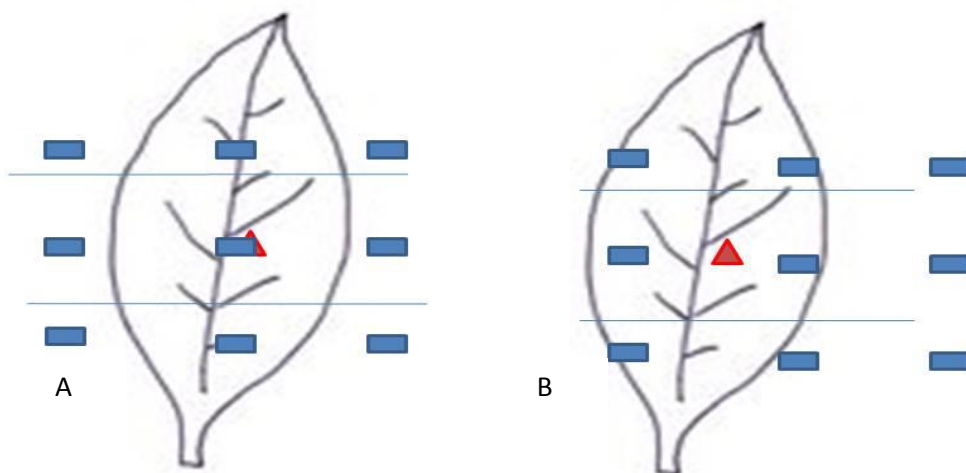
Graf 4.18 Podíl granálních thylakoidů (GT) v chloroplastu z náhodně vybraných poloh na listu. A – apex listu, B – báze listu S – střed listu, M – referenční vzorek ze středu listu mimo hlavní žilku, GT – průměrné hodnoty, A:(n=28), B:(n=32),M:(n=20), S:(n=40), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. V pravém horním rohu jsou uvedeny výsledky ANOVA dvojného třídění s interakcí, efekt polohy na listu, stromu a interakce. Vždy je uvedena dosažená hodnota p. *průkaznost na hladině p.



Graf 4.19 Poměrné zastoupení granálních thylakoidů (GT). M – referenční vzorek ze středu listu, S – vzorky odebrané pomocí SUR ze středu listu. Sloupec označuje průměr naměřených hodnot (M: n=20, S: n=40), chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán, když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, dvouvýběrový t-test.



Obr. 4.10 Rozdělení listu na jednotlivé části: apex, střed, báze, ze kterých byly odebírány vzorky, pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru (SUR).



Obr. 4.11 Polohy na listu, ze kterých byly odebírány vzorky, pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru (SUR) ■, referenční hodnota ze středu listu ▲. A – Situace, kdy se vzorek z referenční hodnoty překrývá se vzorkem ze středu vybraným pomocí SUR. B – Situace, kdy se vzorek z referenční hodnoty nepřekrývá se vzorkem ze středu vybraným pomocí SUR. Linky oddělují jednotlivé části listu: apex, střed, báze.

5. DISKUSE

Následující kapitola je věnována zhodnocení a diskusi získaných výsledků s nastudovanými údaji z literatury. Nejprve budou diskutovány různé experimentální systémy, které je možné použít při studiu vybraných parametrů. Poté se zaměřím na aplikaci stereologické bodové metody. Dále bude zhodnocen vliv EC CO₂ a různé ozáření na vybrané anatomické parametry chloroplastů buku lesního a nakonec variabilita ultrastruktury chloroplastů v rámci čepele listu v závislosti na poloze odebraného segmentu listu.

5.1 Diskuse experimentálních systémů

Existuje mnoho experimentálních systémů, které umožňují studium vlivu EC na rostliny.

Jednou z možností je pěstování v květech, klimatizovaných komorách či sklenících. Tato metoda umožňuje regulaci sledovaného faktoru, vnitřní podmínky ovšem neodpovídají přirozenému prostředí a rostliny jsou často limitovány prostorem. Proto se zde mohou pěstovat pouze samostatní jedinci, obvykle pokusy malých rozsahů (Pinkard *et al.*, 2010). Navíc tyto systémy mohou trpět „komorovým“ efektem (vyšší vlhkost, teplota, atd.).

Velmi rozšířenou metodou jsou v současné době FACE (Free Air Carbon Enrichment). K nejznámějším systémům FACE patří např. FACE systém Oak Ridge¹, Brookhaven FACE² v USA vedená Ministerstvem energie USA (U.S. Department of Energy), SoyFACE³ Ministerstva zemědělství US (U.S. Department of Agriculture) v Illinois, EucFACE⁴ v Austrálii, Duke FACE⁵ v severní Karolíně v USA, Aspen FACE⁶ vedená MIT (Massachusetts Institute of Technology) a další. V systému FACE jsou rostliny pěstovány v přirozeném prostředí, CO₂ je do prostoru vháněno tryskami umístěnými do kruhu. Rostliny nejsou odděleny od okolí žádnou bariérou, proto se výsledky z těchto experimentů nejvíce blíží skutečnosti. Nevýhodou tohoto otevřeného systému je velká spotřeba CO₂ a tím pádem vysoké finanční náklady. Navíc může docházet v těchto systémech k fluktuaci koncentrace CO₂, což může vést ke zkresleným výsledkům (Long *et al.*, 2004)

V neposlední řadě přichází v úvahu otevřená růstová komora (OTC) a lamelové kulturační sféry s automaticky otevíratelnými okny, které jsou finančně dostupnější než FACE systémy a na rozdíl od uzavřených komor umožňují kultivaci ve srovnatelných podmínkách

okolnímu prostředí (Nátr, 2000; Urban *et al.*, 2001). I otevřené komorové systémy však stále vykazují určitou míru komorového efektu. U velkých lamelových kultivačních sfér je velkou výhodou (také našeho stanoviště na Bílém Kříži) možnost pěstování a pozorování celého zapojeného porostu. I přes to, že byla důsledkem přítomnosti lamelových oken ve sférách snížena ozářenost, bylo dosaženo diferenciací listů na slunný a stinný ekotyp, jejichž rozdíl v ultrastruktuře chloroplastů byl také předmětem mé práce.

¹ Oak Ridge FACE systém: <http://climatechangescience.ornl.gov/content/free-air-co2-enrichment-face-experiment>

² Brookhaven FACE <http://www.bnl.gov/face/>

³ SoyFACE v Illinois <http://www.igb.illinois.edu/soyface/>

⁴ EucFACE <http://www.uws.edu.au/hie/facilities/face>

⁵ Duke FACE <http://face.env.duke.edu/>

⁶ Aspen FACE <http://aspenface.mtu.edu/>

5.2 Diskuse použitých metodických přístupů

Na přípravu vzorků pro TEM, konkrétně odvodnění a zalití do pryskyřice, jsem použila mikrovlnný procesor (Leica EM AMW, Leica Microsystem, Vídeň, Rakousko). Mezi jeho hlavní výhody patří zkrácení času přípravy vzorků ze tří dnů (konvenční chemická příprava) na několik hodin. Pouze zalití vzorků do bločků je potřeba zajistit manuálně. Díky působení mikrovlnného záření dochází k rychlejšímu pronikání zejména fixačního činidla do vzorku, a tedy i zkrácení času přípravy vzorku, bez vlivu na strukturu buněk takto zpracovávaných vzorků (Zechmann & Zellnig, 2009).

Jedním z hlavních metodických úskalí bylo získání optimálního kontrastu pro hodnocení mikrofotografií. Různé typy kontrastů byly pozorovány také u listů lípy (*Tilia cordata* MILL.) v různé fázi ontogeneze (Kutik *et al.*, 1981). Autoři to vysvětlují různým obsahem tanninů v mezofylových buňkách (Tageeva *et al.*, 1981). Vzhledem k tomu, že jsem měla k dispozici listy stejného stáří a přes to byl sledován pozitivní i negativní kontrast, je možné, že obsah tanninů se liší nejen v průběhu vývoje listu, ale také mezi různými jedinci v porostu. Nabízí se také možnost nerovnoměrného výskytu tanninů v rámci listu. V neposlední řadě by také mohlo záviset na pozici buňky v rámci zalitého vzorku, protože rozdílné kontrasty byly sledovány i v rámci jednoho vzorku.

Při studiu odborné literatury jsem narazila pouze na dvě práce, ve kterých se autoři zabývali ultrastrukturou chloroplastů a zároveň na kvantifikaci vybraných parametrů v chloroplastech použili analýzu obrazu. Jednalo se konkrétně o systém analýzy obrazu Optimas (Bioscan Inc., Edmonds, Washington) (Pritchard *et al.*, 1997), či Optimas 4.02 (Perktold *et al.*, 1998). Z vybraných parametrů, kterými se studie zabývají, není jasné, zda byla použita automatická segmentace objektů pomocí prahování analýzy obrazu, či zda autoři ručně struktury obkreslovali. (Pritchard *et al.*, 1997) hodnotili počet plastoglobulů a škrobových zrn v chloroplastech, a také počet thylakoidních membrán v granech. Dále je zajímavá celková plocha chloroplastu a plocha škrobu, kterou zaujímá v chloroplastu.

Tým A. Perktolda (1998) zjišťoval, kromě celkové plochy chloroplastu, také objem těchto komponent v chloroplastu: thylakoidní membrány, škrobová zrna, plastoglobuly a stroma.

Vzhledem k charakteru obrázků získávali autoři své výsledky pravděpodobně metodou ručního obkreslování sledovaných struktur.

Při přímém hodnocení pomocí stereologické bodové metody tento problém odpadá. Její nevýhodou je ovšem nutnost zaučení pozorovatele. Nutnost zaučení pozorovatele se ukazuje zejména v případě tzv. problémových situací, které jsou popsány v kapitole 4.1. Odměnou za použití stereologických metod je přesnost a nevychýlenost odhadu sledovaných parametrů.

Z důvodu časové náročnosti kvantitativního hodnocení se pravděpodobně v literatuře často setkáváme pouze s popisným (kvalitativním) hodnocením ultrastruktury chloroplastů bez jakékoliv kvantifikace. Uvádím zde několik příkladů: „velikost chloroplastů se zvětšila, počet gran se zvýšil, grana měla více thylakoidů“ (Fu *et al.*, 2011); „byla pozorována dezorganizace thylakoidů“ (Saco *et al.*, 2013); „thylakoidy byly napuchlé“ (Kreslavski *et al.*, 2008). Takovéto hodnocení má sice svou informační hodnotu, avšak nemůže být statisticky vyhodnocováno a je třeba je považovat za subjektivní. Navíc není zřejmé, jak častý je výskyt pozorovaných struktur.

Zde bych se ráda zmínila o jedné z problémových situací, které jsou popsány v kapitole 4.1. Jedná se o problém škrobového zrna a okolního dvůrku.

Pevné škrobové zrno je zpravidla ohraničeno černou linkou. Tato linka označuje místo, kde se zastavila difuze fixačního činidla (OsO_4) do buňky. Difuze fixačního činidla (OsO_4) je pomalý proces závislý na mnoha faktorech, např. na velikosti a struktuře vzorku, koncentraci fixačního činidla apod. (Hayat, 1970). Dvůrek pravděpodobně odpovídá zóně metabolicky aktivního škrobu, kde intenzivně probíhá jeho syntéza a degradace. Je možné, že se jedná o normální koloběh vzniku a rozkládání škrobu v chloroplastu. Tento dvůrek okolo škrobového zrna jsem pozorovala pouze u vzorků připravených chemickou fixací. U vzorků zpracovaných pomocí metody vysokotlakého zmrazování (HPF) se dvůrek nevyskytoval (B. Radochová, ústní sdělení). Přichází tedy v úvahu také možnost, že se jedná o artefakt, ke kterému dochází při odumírání buňky v průběhu její fixace, která je pomalejší v případě chemické metody oproti rychlému zmrazení HPF.

Výsledky, týkající se škrobu, jsou vždy hodnoty škrobového zrna i s dvůrkem. Na grafu 4.5 je srovnání hodnot škrobového zrna bez dvůrku a s dvůrkem. Plocha škrobového zrna s dvůrkem je samozřejmě větší, než plocha samotného škrobového zrna. Nebyl prokázán

statisticky významný vliv EC, ani ozářenosti na velikost plochy škrobového zrna, s dvůrkem, nebo bez. Tento výsledek může znamenat dvě věci. Ani jeden ze zkoumaných faktorů opravdu nemá vliv na plochu škrobového zrna. Druhé vysvětlení je takové, že výskyt dvůrku je spojen s použitím metody chemické fixace a je pouhým artefaktem.

Při studiu literatury jsem narazila na několik prací, u kterých se také na mikrofotografiích chloroplastů vyskytovaly útvary okolo škrobových zrn podobné mnou pozorovaným dvůrkům (Pritchard *et al.*, 1997; Oksanen *et al.*, 2001; Oksanen *et al.*, 2005; Zellnig *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Autoři zmiňovaných prací používali ke zpracování vzorků, stejně jako já, chemickou fixaci. V žádné práci se ale útvarům okolo škrobových zrn v textu nevěnovali. Výjimkou je práce autora Reboredo (2012), která se zabývá vlivem zinku na ultrastrukturu chloroplastů. Autor na mikrofotografiích popisuje malé „halo“ mezi škrobovým zrnem a stromatem, a to jak u kontrolních, tak u ošetřených rostlin. Žádné vysvětlení ale nenabízí. Jelikož uvádí, že se objekt vyskytoval u obou ošetření, je pravděpodobné, že jde buď také o artefakt způsobený chemickou fixací, anebo se dvůrek u škrobových zrn přirozeně vyskytuje.

Studiu povrchové morfologie škrobových zrn se zabývá práce autorů (Cabalkova *et al.*, 2008). Kromě povrchové morfologie se práce také zaměřuje na velikost a tvar škrobových zrn u smrku ztepilého (*Pecea abies* L.) pod vlivem EC. Autoři pozorovali na povrchu škrobových zrn různé výstupky, brázdy a póry. Jejich výskyt byl nezávislý na ošetření EC. Stejně jako mé výsledky týkající se oblasti dvůrku okolo škrobu, i zde autoři předpokládají, že povrchové struktury na škrobových zrnech nejsou artefaktem použité metody a vyskytují se přirozeně. Nicméně autoři použili opět pouze chemickou fixaci. Metoda vysokotlakého zmrazování je relativně nová a hypotéza, zda dvůrek okolo škrobového zrna je artefaktem vznikajícím při chemické fixaci, bude potřeba ověřit experimentálně.

5.3 Vliv různé ozářenosti na ultrastrukturu chloroplastů

Ozářenost je přirozený faktor prostředí, který formuje listovou anatomii, ale také strukturu buněk listů. Tento faktor nebyl určen experimentálně, pouze jsem odebírala vždy jeden list z výše položené, osvětlené části stromu a druhý list z níže položené, zastíněné oblasti.

Míra ozáření měla vliv pouze na uspořádání membránového systému. Stinné chloroplasty obsahovaly více granálních thylakoidů (GT), ale také intergranálních thylakoidů (IGT). Poměr obou typů thylakoidů se mezi chloroplasty slunných a stinných listů nezměnil. Ostatní sledované parametry – plocha mediálního řezu chloroplastů, množství plastoglobulů a škrobu - nebyly ovlivněny.

Větší zastoupení granálních thylakoidů při nižší ozáření bylo zjištěno i u jiných druhů rostlin – fialky (*Primulina tabacum* L.) (Liang *et al.*, 2010), rajčete tyčkového (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Fu *et al.*, 2011) či orchideje (*Anoectochilus roxburghii* L.) (Shao *et al.*, 2014). Výsledky jsou v souladu s předpokladem, že při nižší ozáření rostlina potřebuje absorbovat více slunečního záření, a tak investuje do vybudování gran, která efektivněji slouží k absorpci excitační energie, díky přítomnosti anténních komplexů LHCII a fotosystémů II (Kirchhoff, 2013).

Vzhledem k tomu, že nedošlo ke změně poměru GT a IGT, je možné, že si rostliny zachovávají určitý stabilní poměr granálních a intergranálních thylakoidů a na různou míru ozáření reagují jiným způsobem. K této hypotéze se přiklání také práce autorů (Albertsson & Andreasson, 2004), kde autoři uvádí, že podíl intergranálních thylakoidů, tzn. plocha intergranálních thylakoidů uvedena v procentech celkové plochy thylakoidních membrán, zůstává konstantní, okolo 20%. Tento poměr je nezávislý na velikosti gran. Tento údaj je také velice podobný výsledkům mé práce, které jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Podíl IGT	
AE	18%
AS	18%

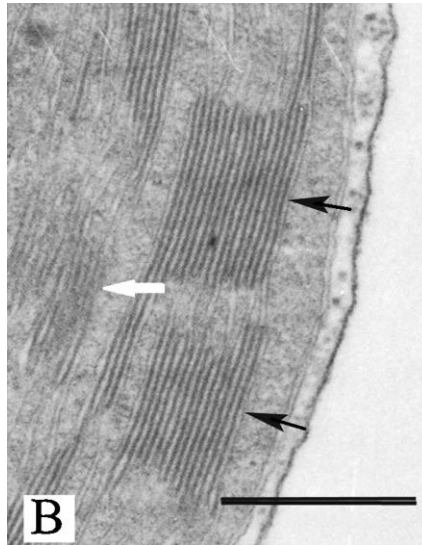
Tab. 5.1 Podíl intergranálních thylakoidů (IGT) z celkového počtu thylakoidů. AE – aktuální koncentrace CO₂, slunný list; AS – aktuální koncentrace CO₂, stinný list.

Změna v uspořádání membrán, na základě různé intenzity ozáření, se může na mikroskopické úrovni projevit navyšováním počtu thylakoidů v granech. Já jsem se tímto parametrem ve své práci nezabývala. Orientace gran v chloroplastech je často různá, z tohoto důvodu je počítání jednotlivých thylakoidních membrán v granu obtížné. Někteří autoři sledovali u různých druhů rostlin nárůst počtu thylakoidních membrán v granech při nižší ozáření, např. u fialky (*Primulina tabacum* L.) (Liang *et al.*, 2010), rajčete tyčkového

(*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Fu *et al.*, 2011), či orchideje (*Anoectochilus roxburghii* L.) (Shao *et al.*, 2014). Ani jedna práce ovšem bohužel neuvádí metodu, kterou byly výsledky získány.

Jednotlivé thylakoidy v granech počítali také autoři (Kordyum & Klimenko, 2013) kteří se zbývali vlivem ozáření na ultrastrukturu chloroplastů ve vodním prostředí. Dospěli k výsledku, že čím níže se listy stulíku (*Nuphar lutea* L.) nacházely pod vodní hladinou, tím více vykazovaly charakter stinných listů. Chloroplasty listů rostoucích nad hladinou, či splývající na hladině měly čočkovitý tvar a byly situovány podél antiklinální buněčné stěny v palisádovém parenchymu. Největší procento gran se skládalo z 2-5 thylakoidů, častý byl výskyt plastoglobulů, škrobová zrna se objevovala jen zřídka. U ponořených listů byly chloroplasty situovány podél periklinálních buněčných stěn nerozlišeného parenchymu. S přibývajícím hloubkou se velikost chloroplastů zvětšovala a větší část chloroplastů zabíraly thylakoidní membrány. Stále častěji se objevovala grana s větším počtem thylakoidů, až 44 thylakoidů v granu. Plastoglobuly a škrobová zrna se stávaly v chloroplastech čím dál vzácnější.

Na obrázku 5.2.1. z práce autorů Kordyum & Klimenko (2013) uvádím příklad dvou situací, na které můžeme při snaze počítání thylakoidů v granech narazit. Černou šipkou jsou označena grana, která byla řízlá kolmo, jsou tedy dobře rozeznatelné jednotlivé thylakoidní membrány a je možné je jednoduše kvantifikovat. Bílou šipkou jsem označila granum, které bylo pravděpodobně řízlé v jiném než kolmém směru. Membrány jsou rozmazané a nelze určit jejich přesný počet. V případě, že bychom chtěli počítat thylakoidy v granech na tomto obrázku, je možné si vybrat pouze grana, která jsou označena černou šipkou. V takovém případě bychom ale dospěli k vychýlenému odhadu.



Obr. 5.2.1 Detail chloroplastu mezofylové buňky ponořených listů stulíku (*Nuphar lutea* L.) v hloubce 0,5 m. Černými šipkami jsou označena grana, u kterých je možno rozeznat a spočítat jednotlivé thylakoidy. Bílou šipkou je označeno granum, u kterého není, podle mě, možné jednoznačně určit přesný počet thylakoidů. Úsečka znázorňuje délku 0,5 μm . (Upraveno podle Kordyum & Klimenko, 2013).

Na molekulární úrovni dochází v reakci na proměnlivé světelné podmínky k reorganizaci proteinových komplexů v thylakoidních membránách chloroplastů při procesu state transition (viz kapitola 2.3.2). Při nižší ozáření také dochází u izolovaných chloroplastů špenátu (*Spinacea oleraceae* L.) ke snížení množství fotosystému II (Albertsson & Andreasson, 2004) a naopak narůstá počet volných anténních komplexů LHCI. Také dochází k poklesu obsahu cytochromového komplexu b_6f v granech chloroplastů vystavených nižším ozářením oproti thylakoidům vystaveným vyšší ozáření. Tato remodelace granálních thylakoidů u rostlin adaptovaných na nízkou intenzitu světelného záření vede k zefektivnění funkce absorpce záření. Naopak funkce elektron-transportního řetězce je potlačena. Strategie má sloužit pro efektivnější využití limitujících zdrojů (světla apod.) v podmínkách nízké ozáření (Kirchhoff *et al.*, 2007). Nižší hustota velkých komplexů PS II v granech také umožňuje snazší difuzní cestu pro plastochinon při cestě od PSII na cytochromový komplex b_6f (Kirchhoff *et al.*, 2004).

Ke stejným závěrům dospěli a jiní autoři (Kouril *et al.*, 2013), kteří se zabývali studiem izolovaných chloroplastů u huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.), ale při ošetření rostlin vysokou ozářeností. Zjistili, že u rostlin kontrolních či rostoucích ve vyšší ozáření jsou v chloroplastech mezi jednotlivými fotosystémy II větší prostory, které umožňují snazší difuzi

plastochinonu v membráně. Při nižší ozáření přesto pozorovali hustotu PSII nižší, než v chloroplastech rostlin vystavených vyšší ozáření.

Detekce jednotlivých komplexů nebyla předmětem mé diplomové práce, ale předpokládám, že podíl granálních thylakoidů vypovídá o zastoupení PS II spolu s LHC II a PSII.

5.4 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ a dalších faktorů prostředí na ultrastrukturu chloroplastů

Koncentrace oxidu uhličitého je jeden z faktorů prostředí, které ovlivňují nejen fyziologické procesy v rostlinách, ale také anatomickou stavbu listů a strukturu buněk.

Vliv EC jsem prokázala pouze u některých z měřených parametrů chloroplastů. Významně vzrostl podíl škrobu na mediálním řezu chloroplastů listů buku pěstovaného při EC, a to u slunných i stinných listů. Tento výsledek není až tak překvapující, protože je známo, že při kultivaci rostlin při vyšší koncentraci CO₂ dochází k nárůstu asimilace CO₂ (Kosvancova *et al.*, 2009). Předpokládá se, že nárůst asimilace CO₂ se projeví v syntéze většího množství asimilátů. Asimiláty jsou v rostlině využity několika způsoby. Mohou být spotřebovány na místě syntézy, nebo jsou transportovány do jiných částí rostliny, do tzv. sinků. Sinky jsou místa, kde jsou asimiláty potřebné, ale je jich nedostatek (mladé listy), nebo zde k jejich syntéze nedochází vůbec (kořeny), anebo slouží k jejich uskladnění, většinou v podobě zásobního škrobu do amyloplastů (zásobní orgány).

V případě, že rychlost syntézy asimilátů je větší, než rychlost jejich spotřebování či ukládání, vytváří se zásoby asimilačního škrobu v chloroplastech ve formě škrobových zrn (Pritchard *et al.*, 1997).

Nadměrná akumulace škrobových zrn v chloroplastech může být také znakem vyčerpání sinků rostliny pro ukládání uhlíku (Arp, 1991; Ghildiyal *et al.*, 2001).

U chloroplastů ošetřených EC byl pozorován trend zvětšování škrobových zrn. Většina prací, které jsme měla k dispozici, se věnuje tématu vlivu EC u bylin (Teng *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2012). K obdobným výsledkům jako já dospěli také autoři (Cabalkova *et al.*, 2008), kteří se zabývali velikostí a tvarem škrobových zrn u smrku ztepilého (*Picea abies* L.). Chloroplasty jednoletých jehlic ošetřených EC obsahovaly větší škrobová zrna v porovnání s chloroplasty jehlic pěstovaných v atmosférické koncentraci CO₂.

I přes na první pohled podobné výsledky, jsem si vědoma toho, že nemohu srovnávat své výsledky získané z mediálního řezu chloroplastem s výsledky získanými izolací škrobových zrn z chloroplastu.

Počet škrobových zrn se v závislosti na koncentraci CO₂ neměnil, pohyboval se průměrně okolo dvou zrn na mediálním řezu chloroplastem v obou variantách. Počet zrn samozřejmě neodpovídá absolutnímu počtu škrobových zrn v celém chloroplastu. V práci jsem se zaměřila pouze na poměrné zastoupení škrobu na mediálním řezu chloroplastem a jsem si vědoma toho, že z naměřených hodnot nemohu odhadovat počet škrobových zrn v celém chloroplastu. Na počítání částic v 3D objemu je zapotřebí fyzických sériových řezů, či optických sériových řezů a použití stereologické metody disector, která umožňuje nevychýlené odhady daných parametrů (Kubínova *et al.*, 2014).

Předpokládá se, že nadměrná akumulace škrobu může negativně ovlivňovat vnitřní organizaci thylakoidních membrán v chloroplastu, a tak mimo jiné přispívat k aklimační depresi (Yelle *et al.*, 1989). Velká škrobová zrna mohou zastiňovat světlosběrné komplexy a snižovat jejich efektivitu zachytávání energie slunečního záření, narušovat rovnováhu mezi fotofosforylací, redukcí NADP a navazujícími procesy jako je fixace uhlíku v Calvinově cyklu (Pritchard *et al.*, 1997), či přímo mechanicky poškozovat thylakoidní membrány (Marek, 2011).

Počet a velikost škrobových zrn se mění během dne (Kivimäenpää *et al.*, 2001) a také v průběhu sezóny (Lipavská *et al.*, 2000; Cabalková *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že jsem vzorky odebírala v průběhu dvou dnů na konci června, vždy v čase od 12.00 do 13.00 hod., předpokládám, že tyto dva faktory neměly na vybrané anatomické parametry chloroplastů vliv.

Při působení EC po dobu jedné sezóny sledovali autoři Cabalková *et al.* (2008) velké množství škrobu v chloroplastech ještě v říjnu. Při normálním vývoji se škrob na podzim u jehličnatých dřevin vyskytuje spíše výjimečně, kvůli nástupu zimního otužování (frost hardening). Zimní otužování je proces, při kterém se vytrvalé rostliny připravují na zimní období a získávají rezistenci vůči mrazu u ošetřených rostlin smrku ztepilého (*Picea abies* L.) se naopak v říjnu vyskytovala největší škrobová zrna (Cabalková *et al.*, 2008). Tato situace

nasvědčuje hypotéze, že u stromů ošetřených vyšší koncentrací CO₂ došlo k posunutí vývoje jehlic v dané sezóně a ještě v říjnu byly schopny škrob akumulovat.

U borovice bahenní (*Pinus palustris* L.) autoři Pritchard *et al.* (1997) pozorovali znaky zimního otužování jak u kontrolních, tak u ošetřených rostlin EC. Jedním z hlavních znaků zimního otužování je snižující se obsah škrobu v chloroplastech. Tomu odpovídají i výsledky práce (Pritchard *et al.*, 1997). Na podzim obsahovaly chloroplasty borovice méně škrobových zrn než na jaře. Na podzim dochází k degradaci škrobu z důvodu využití vzniklých metabolitů na jiné procesy v rostlině. Ze škrobu vznikají osmoticky aktivní látky – osmoprotektanty, které pomáhají rostlině vyrovnat se stresovými podmínkami. Patří sem nestrukturní, ve vodě rozpustné sacharidy, které chrání rostlinu před vznikem krystalků ledu v buňkách pletiv (Dalmannsdottir *et al.*, 2001) a také sacharidy rafinozové řady (RFO) (Liu *et al.*, 1998). EC ovšem ovlivňovala obsah škrobu u obou období stejně. Zvýšilo se množství škrobu v chloroplastech vzorků odebraných na jaře i na podzim.

Mezi další znaky zimního otužování patří desintegrace thylakoidů, bobtnání chloroplastů, či nárůst počtu plastoglobulů. Tyto znaky autoři (Pritchard *et al.*, 1997) na podzim sledovali pouze u stromů pěstovaných ve EC. Je možné, že EC dostává listy předčasně do stavu zimního otužování, než by tomu bylo v podmínkách atmosférické koncentrace CO₂. Tato hypotéza odpovídá i reakci plastoglobulů, kterých bylo na jaře v chloroplastech méně, než na podzim (Pritchard *et al.*, 1997). Důvodem je fakt, že plastoglobuly se účastní rozkladu membrán, ukládají se do nich metabolity vzniklé při degradaci membrán, která nastává na podzim (Ghosh *et al.*, 1994). Výše uvedené charakteristiky jsou ale považovány za obecné pro zimní otužování a jsou typické pro nespecifický stres u rostlin (Senser *et al.*, 1975). Není pravděpodobné, že bych pozorovala podobné znaky, protože jsem vzorky odebírala v červnu.

EC také pravděpodobně urychluje u některých rostlin nástup senescence. Tento trend byl pozorován nejen u jehličnatých stromů (Houpis *et al.*, 1988), ale také u některých kultivarů sóji (*Glycine max* (L.) Merr.). Autoři (Hao *et al.*, 2012) sledovali rozmazané a těžko rozeznatelné jednotlivé membrány granech. U granálních thylakoidů také docházelo k jejich postupnému oddělování. Předčasná senescence také pravděpodobně přispěla k nástupu aklimační deprese u daných kultivarů sóji. Jiný případ autoři sledovali u druhého kultivaru, kde k předčasné senescenci a aklimační depresi nedošlo. Při senescenci dochází k úbytku membrán a vzniklé metabolity se ukládají do plastoglobulů. (Ghosh *et al.*, 1994). Je tedy

zřejmé, že nejen reakce na EC je druhově specifická, ale také samotné uspořádání membrán v chloroplastu je druhově specifické (Rumak *et al.*, 2012).

Jedna z mých hypotéz byla, že při EC dojde k nárůstu poměru intergranálních thylakoidů ku granálním thylakoidům. Někteří autoři také sledovali zvýšení poměru intergranálních thylakoidů ku granálním thylakoidům. Vysvětlovali si to tím, že díky zvětšení počtu či velikosti škrobových zrn dojde k mechanickému oddělení granálních thylakoidů (Pritchard *et al.*, 1997; Teng *et al.*, 2006) Naopak (Griffin *et al.*, 2001) zvýšený obsah škrobu nepozorovali, ale přesto bylo zastoupení thylakoidů ovlivněno ve prospěch intergranálních. Důvodem byl podle autorů fakt, že větší zastoupení intergranálních thylakoidů vede k rychlejší tvorbě NADPH a ATP díky zrychlení karboxylace při EC. Obě molekuly jsou potřebné pro zajištění zvýšených energetických nároků na růst. Je tedy možné, že případná změna poměru intergranálních thylakoidů ku granálním thylakoidům může být ovlivněna změnami energetickými nároky rostliny v prostředí EC. Cyklický elektronový transport, odehrávající se na intergranálních thylakoidech, bývá za podmínek zvýšeného požadavku ATP posílen. Je to z důvodu zvýšeného přesunu protonových iontů H^+ do lumen thylakoidních membrán a tento gradient protonu je poté využit na vznik ATP. Vzhledem k tomu, že v podmínkách EC dochází k poklesu rychlosti fotorespirace (Long (Long *et al.*, 2004) *et al.*, 2004) a tedy menším nárokům na produkci ATP (Rochaix, 2011) může tedy naopak v podmínkách EC teoreticky dojít k poklesu hodnoty IGT/GT. Mé výsledky tuto hypotézu potvrzují. Vzájemný poměr granálních ku intergranálním thylakoidům při EC vzrostl.

Celkově ale chloroplasty stromů pěstovaných v EC vykazovaly trend nižšího podílu thylakoidních membrán, jak granálních, tak intergranálních. Důvodem může být, jak bylo zmíněno výše, nárůst škrobových zrn, která zabírají větší objem chloroplastu a dochází k mechanickému oddělení granálních thylakoidů (Teng *et al.*, 2006; Pritchard *et al.*, 1997) či není již díky snížené transpiraci takový požadavek na vznik ATP (Rochaix, 2011).

Nižší poměrné zastoupení obou typů thylakoidů bylo zjištěno i u rostlin kukuřice, které byly vystaveny stresu mrazem. (Kutik *et al.*, 2004) toto pozorování odůvodňují tím, že rostlina ve stresových podmínkách snižuje obsah membrán, kvůli přítomnosti fotosystémů, které jsou citlivé na stres, resp. metabolity, které mohou při stresu vznikat (reaktivní formy kyslíku apod.)

S touto hypotézou bych mohla souhlasit i v případě mých výsledků, za předpokladu, že EC je pro rostlinu stresovým faktorem.

Je tedy zřejmé, že EC má za následek zvýšenou akumulaci škrobu v chloroplastech. Větší a početnější škrobová zrna ovlivňují uspořádání membránového systému thylakoidů, což se zpětně odráží v metabolismu rostliny (Sun *et al.*, 2011).

Existuje také řada dalších faktorů, které ovlivňují ultrastrukturu buňky, např. teplota. Jako adaptace na extrémní teploty byly sledovány chloroplastové výběžky (Bourett *et al.*, 1999; Holzinger *et al.*, 2007). Některé chloroplasty, které jsem měla k dispozici pozorovat, tyto výběžky měly. Nabízejí se dvě příčiny jejich výskytu. Výskyt výběžku by mohl být důsledkem dlouhotrvající fixace, podobně jako u autorů (Musser *et al.*, 1984). Tuto možnost bych vyloučila, vzhledem k tomu, že fixace vzorků, které jsem měla k dispozici, trvala pouze cca 1,5 hodiny (více viz kapitola 3.2). Druhou pravděpodobnější možností je, že výběžky pozorovaných chloroplastů jsou adaptací na růst ve vyšších polohách a s tím související kratší růstovou sezonou, vzhledem k poloze stanoviště, ze kterého vzorky pocházejí (Lhotakova *et al.*, 2012).

5.5 Variabilita ultrastruktury chloroplastů v rámci listu

Odlišnost mezi hodnotami ve středu listu a hodnotami získanými systematicky rovnoměrně náhodným výběrem (SUR) může být způsobena přítomností marginálních meristémů na okrajích listů. Je možné, že díky přítomnosti marginálních meristémů se na listu s morfologicky odlišenou čepelí vyskytují gradienty anatomických parametrů, v mém případě poměrného zastoupení granálních thylakoidů v chloroplastech. Marginální meristémy jsou dělivá pletiva na okrajích listů, která umožňují růst listů do šířky (Votrubová & Olga, 2011). Očekávala jsem, že ve středu listu (referenční hodnota) budou listy vykazovat konzistentnější výsledek, jelikož jejich vývoj je v této části již dokončen. Naopak na okrajích listů bych předpokládala větší diferenciaci anatomických parametrů vzhledem k výskytu marginálních meristémů.

Jak je také vidět z grafu 4.18, záleží nejen na poloze na listu, ze které byl vzorek odebrán, ale také na každém jedinci. Za jedince můžeme považovat strom, protože každý strom se přizpůsobuje prostředí, ve kterém žije jiným způsobem. A i v rámci tak malého prostoru, jako je skleník, ve kterém byly stromy pěstovány, se mohou vyskytovat gradienty

dalších faktorů, např. živin, které ovlivňují anatomii listů a procesy probíhají v rostlinách. Jedinec ale také může být jeden list, protože také v rámci jednoho stromu může docházet ke stínění si jednotlivých listů mezi sebou, což může způsobovat různé gradienty anatomických parametrů.

Rozdíl mezi jednotlivými vzorky by také mohl být způsoben časem a denní dobou, ve které byly vzorky odebrány. Vzhledem k tomu, že listy byly odebrány vždy zároveň ze sféry a AC i EC a to během 15 - ti minut, nepředpokládám, že by se v mých výsledcích tento faktor projevil. Nepozorovala jsem tedy mezi vzorky žádný konzistentní trend anatomických parametrů chloroplastů v rámci listu.

Gradienty anatomických parametrů v rámci listu sledoval také (Pazourek, 1966) ve výskytu průduchů a (Slavík, 1963) také v intenzitě transpirace, fotosyntézy, či dýchání. Zabývali se gradienty jednak ve směru od báze k apexu, ale také od středu k okrajům listů. U všech parametrů, kromě velikosti průduchů, bylo zjištěno, že ve směru od báze k apikální části listu, stejně tak od středu k okraji listu, dochází k jejich snižování (Slavík, 1963). Moje výsledky naopak naznačují, že na okrajích listů se granálních thylakoidů vyskytuje v chloroplastech více než ve střední části listu.

Lze tedy uzavřít, že střed listu je referenční hodnota, která však není reprezentativní pro celou čepel listu.

6. ZÁVĚR

Tato kapitola stručně shrnuje splnění cílů a stanovených hypotéz.

Cíl 1 a hypotézy 1 a 2:

Z uvedených výsledků vyplývá, že oba sledované faktory – koncentrace CO₂ i ozáření – významně ovlivňují ultrastrukturu chloroplastů buku lesního (*Fagus sylvatica* L.).

- Ozáření

Ozáření měla vliv zejména na uspořádání membránového systému. U stinných listů se v chloroplastech vykytoval vyšší podíl granálních i intergranálních thylakoidů, vzájemný poměr byl nezměněn. Byl pozorován trend většího zastoupení plastoglobulů v chloroplastech u slunných listů. Vliv ozáření na plochu chloroplastů či poměrné zastoupení škrobu se neprokázal.

- Koncentrace CO₂

Chloroplasty listů buku pěstovaného při EC měly vyšší podíl škrobu na ploše mediálního řezu a to u slunných i stinných listů. U chloroplastů ošetřených EC byl pozorován trend zvětšování škrobových zrn, avšak jejich počet na mediálním řezu se v závislosti na koncentraci CO₂ neměnil. Chloroplasty stromů z EC vykazovaly trend nižšího podílu gran, i nižší podíl intergranálních thylakoidů. Vzájemný poměr GT/IGT vzrostl při EC.

Cíl 2 a hypotéza 3:

Při vyhodnocování výsledků, zda kvantitativně vyjádřené parametry ultrastruktury chloroplastů ve střední části listu mohou být považovány za reprezentativní pro celou čepel listu, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl u těchto parametrů: plocha mediálního řezu chloroplastu, poměrné zastoupení škrobu, počet a velikost škrobových zrn, ani poměrné zastoupení plastoglobulů v chloroplastu.

Naopak bylo zjištěno, že poměrné zastoupení granálních thylakoidů v chloroplastu je vyšší u vzorků odebraných z různých poloh na čepeli listu pomocí SUR. Poměrné zastoupení intergranálních thylakoidů se nelišilo, ale poměr GT/IGT byl vyšší u vzorků odebraných z různých poloh na čepeli listu pomocí SUR.

Oproti předpokladu byla zjištěna větší variabilita hodnot u vzorků odebraných z referenční hodnoty ze středu listu než u vzorků, které byly odebrány ze středu listy pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru (SUR).

Při studiu anatomických, ale také fyziologických parametrů rostlin musíme mít na paměti, že dané parametry a reakce stromů ovlivňuje, kromě zkoumaných faktorů, mnoho dalších vlivů, jak vnitřních (např. stáří rostliny), tak vnějších (např. teplota). Jedním z nich je také dostupnost minerálních živin v půdě, které jsou potřeba pro zajištění správného růstu a vývoje rostliny. Je tedy možné, že rostliny neumí profitovat ze EC, protože jim chybí jiné živiny, např. dusík (Pritchard *et al.*, 1997). Nelze tedy jednoznačně uzavřít, že rostliny rostoucí v EC budou díky této skutečnosti mít výhodu oproti rostlinám žijícím za normálních podmínek.

Většina prací, na které jsem při studiu literatury narazila, se zabývá vlivem daných faktorů na semenáčky či mladé rostliny, jak tomu bylo v našem případě, kdy stromy byly 10-tileté. Domnívám, že reakce juvenilních stromů může být odlišná od reakce dospělých stromů. Prací na dospělých stromech je však nedostatek kvůli časové náročnosti provedení takovýchto experimentů a relativně nedávné doby počátků studia vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na dřeviny. Dospělé porosty by neměly mít, podle mých výsledků, v obdobných podmínkách větší problémy.

Na závěr bych ráda zdůraznila, že práce je součástí řešení grantového projektu GAČR P501/10/0340, který je zaměřen na studium vlivu zvýšené koncentrace CO₂ a ozáření na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu buku lesního na různých hierarchických úrovních, který zahrnuje studium výzkumných týmů. Ve své diplomové práci jsem se soustředila pouze na vyhodnocení a diskuzi výsledků ultrastrukturální analýzy chloroplastů buku, kterou jsem sama prováděla.

Doufám, že tato práce bude sloužit jako zdroj informací a doporučení k dalšímu studiu vlivu zvýšené koncentrace CO₂ a ozáření na strukturu chloroplastů listnatých dřevin, kde zdaleka ještě nebyly zodpovězeny všechny otázky.

7. ZDROJE A CITOVANÁ LITERATURA

- Ainsworth EA, Rogers A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising CO₂ : mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell and Environment* 30(3): 258-270.
- Ainsworth EA, Rogers A, Vodkin LO, Walter A, Schurr U. 2006. The effects of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. *Plant Physiology* 142(1): 135-147.
- Albertsson PA. 2001. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends in Plant Science* 6(8): 349-354.
- Albertsson PA, Andreasson E. 2004. The constant proportion of grana and stroma lamellae in plant chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 121(2): 334-342.
- 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(6): 1451-1461.
- Alkhatib R, Maruthavanan J, Ghoshroy S, Steiner R, Sterling T, Creamer R. 2012. Physiological and ultrastructural effects of lead on tobacco. *Biologia Plantarum* 56(4): 711-716.
- Allen JF, Forsberg J. 2001. Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science* 6(7): 317-326.
- Amunts A, Nelson N. 2008. Functional organization of a plant photosystem I: Evolution of a highly efficient photochemical machine. *Plant Physiology and Biochemistry* 46(3): 228-237.
- Anderson JM. 1999. Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 26(7): 625-639.
- Anderson JM, Andersson B. 1988. THE DYNAMIC PHOTOSYNTHETIC MEMBRANE AND REGULATION OF SOLAR-ENERGY CONVERSION. *Trends in Biochemical Sciences* 13(9): 351-355.
- Anderson JM, Chow WS, De Las Rivas J. 2008. Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma. *Photosynthesis Research* 98(1-3): 575-587.
- Anderson JM, Horton P, Kim EH, Chow WS. 2012. Towards elucidation of dynamic structural changes of plant thylakoid architecture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 367(1608): 3515-3524.
- Andersson B, Anderson JM. 1980. LATERAL HETEROGENEITY IN THE DISTRIBUTION OF CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEXES OF THE THYLAKOID MEMBRANES OF SPINACH-CHLOROPLASTS. *Biochimica Et Biophysica Acta* 593(2): 427-440.
- Armbruster U, Labs M, Pribil M, Viola S, Xu WT, Scharfenberg M, Hertle AP, Rojahn U, Jensen PE, Rappaport F, Joliot P, Dormann P, Wanner G, Leister D. 2013. Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature. *Plant Cell* 25(7): 2661-2678.
- Armer HEJ, Mariggi G, Png KMY, Genoud C, Monteith AG, Bushby AJ, Gerhardt H, Collinson LM. 2009. Imaging Transient Blood Vessel Fusion Events in Zebrafish by Correlative Volume Electron Microscopy. *Plos One* 4(11): 10.

- Arp WJ. 1991. EFFECTS OF SOURCE-SINK RELATIONS ON PHOTOSYNTHETIC ACCLIMATION TO ELEVATED CO₂. *Plant Cell and Environment* 14(8): 869-875.
- Arvidsson PO, Sundby C. 1999. A model for the topology of the chloroplast thylakoid membrane. *Australian Journal of Plant Physiology* 26(7): 687-694.
- Assmann SM. 1993. SIGNAL-TRANSDUCTION IN GUARD-CELLS. *Annual Review of Cell Biology* 9: 345-375.
- Austin JR, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* 18(7): 1693-1703.
- Austin JR, Staehelin LA. 2011. Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography. *Plant Physiology* 155(4): 1601-1611.
- Bourett TM, Czymbek KJ, Howard RJ. 1999. Ultrastructure of chloroplast protuberances in rice leaves preserved by high-pressure freezing. *Planta* 208(4): 472-479.
- Brehelin C, Kessler F. 2008. The Plastoglobule: A Bag Full of Lipid Biochemistry Tricks. *Photochemistry and Photobiology* 84(6): 1388-1394.
- Brehelin C, Kessler F, van Wijk KJ. 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science* 12(6): 260-266.
- Bushby AJ, P'ng KMY, Young RD, Pinali C, Knupp C, Quantock AJ. 2011. Imaging three-dimensional tissue architectures by focused ion beam scanning electron microscopy. *Nature Protocols* 6(6): 845-858.
- Cabalkova J, Pribyl J, Skladal P, Kulich P, Chmelik J. 2008. Size, shape and surface morphology of starch granules from Norway spruce needles revealed by transmission electron microscopy and atomic force microscopy: effects of elevated CO₂ concentration. *Tree Physiology* 28(10): 1593-1599.
- Chen WR, Zheng JS, Li YQ, Guo WD. 2012. Effects of high temperature on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, chloroplast ultrastructure, and antioxidant activities in fingered citron. *Russian Journal of Plant Physiology* 59(6): 732-740.
- Chow WS, Kim EH, Horton P, Anderson JM. 2005. Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochemical & Photobiological Sciences* 4(12): 1081-1090.
- Crumpton-Taylor M, Grandison S, Png KMY, Bushby AJ, Smith AM. 2012. Control of Starch Granule Numbers in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Physiology* 158(2): 905-916.
- Dalmanndottir S, Helgadottir A, Gudleifsson BE. 2001. Fatty acid and sugar content in white clover in relation to frost tolerance and ice-encasement tolerance. *Annals of Botany* 88: 753-759.
- Daum B, Kuhlbrandt W. 2011. Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany* 62(7): 2393-2402.
- Daum B, Nicastro D, II JA, McIntosh JR, Kuhlbrandt W. 2010. Arrangement of Photosystem II and ATP Synthase in Chloroplast Membranes of Spinach and Pea. *Plant Cell* 22(4): 1299-1312.

- Dekker JP, Boekema EJ. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1706(1-2): 12-39.
- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC. 2005. Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant Journal* 41(6): 815-830.
- Dixon RK. 1994. CARBON POOLS AND FLUX OF GLOBAL FOREST ECOSYSTEMS (VOL 263, PG 185, 1994). *Science* 265(5169): 171-171.
- Fu QS, Yang RC, Wang HS, Zhao B, Zhou CL, Ren SX, Guo YD. 2013. Leaf morphological and ultrastructural performance of eggplant (*Solanum melongena* L.) in response to water stress. *Photosynthetica* 51(1): 109-114.
- Fu QS, Zhao B, Wang XW, Wang YJ, Ren SX, Guo YD. 2011. The Responses of Morphological Trait, Leaf Ultrastructure, Photosynthetic and Biochemical Performance of Tomato to Differential Light Availabilities. *Agricultural Sciences in China* 10(12): 1887-1897.
- Gessler A, Keitel C, Kreuzwieser J, Matyssek R, Seiler W, Rennenberg H. 2007. Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees-Structure and Function* 21(1): 1-11.
- Ghannoum O, Von Caemmerer S, Ziska LH, Conroy JP. 2000. The growth response of C-4 plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant Cell and Environment* 23(9): 931-942.
- Ghildiyal MC, Rafique S, Sharma-Natu P. 2001. Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ in relation to leaf saccharide constituents in wheat and sunflower. *Photosynthetica* 39(3): 447-452.
- Ghosh S, Hudak KA, Dumbroff EB, Thompson JE. 1994. RELEASE OF PHOTOSYNTHETIC PROTEIN CATABOLITES BY BLEBBING FROM THYLAKOIDS. *Plant Physiology* 106(4): 1547-1553.
- 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(5): 2473-2478.
- Gundersen HJG, Jensen EB. 1987. THE EFFICIENCY OF SYSTEMATIC-SAMPLING IN STEREOLOGY AND ITS PREDICTION. *Journal of Microscopy-Oxford* 147: 229-263.
- Hanba YT, Kogami H, Terashima I. 2002. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell and Environment* 25(8): 1021-1030.
- Hao XY, Han X, Lam SK, Wheeler T, Ju H, Wang HR, Li YC, Lin ED. 2012. Effects of fully open-air CO₂ elevation on leaf ultrastructure, photosynthesis, and yield of two soybean cultivars. *Photosynthetica* 50(3): 362-370.
- Hayat MA 1970. Principles and techniques of electron microscopy.
- Herbstova M, Tietz S, Kinzel C, Turkina MV, Kirchhoff H. 2012. Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(49): 20130-20135.
- Holisova P, Zitova M, Klem K, Urban O. 2012. Effect of Elevated Carbon Dioxide Concentration on Carbon Assimilation under Fluctuating Light. *Journal of Environmental Quality* 41(6): 1931-1938.

- Holzinger A, Buchner O, Lutz C, Hanson MR. 2007. Temperature-sensitive formation of chloroplast protrusions and stromules in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 230(1-2): 23-30.
- Houpis JLJ, Surano KA, Cowles S, Shinn JH. 1988. CHLOROPHYLL AND CAROTENOID CONCENTRATIONS IN 2 VARIETIES OF *PINUS-PONDEROSA* SEEDLINGS SUBJECTED TO LONG-TERM ELEVATED CARBON-DIOXIDE. *Tree Physiology* 4(2): 187-193.
- Hrstka M, Urban O, Babak L. 2012. Seasonal changes of Rubisco content and activity in *Fagus sylvatica* and *Picea abies* affected by elevated CO₂ concentration. *Chemical Papers* 66(9): 836-841.
- Jacob M, Leuschner C, Thomas FM. 2010. Productivity of temperate broad-leaved forest stands differing in tree species diversity. *Annals of Forest Science* 67(5): 9.
- Jahns P, Latowski D, Strzalka K. 2009. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1787(1): 3-14.
- James MG, Robertson DS, Myers AM. 1995. CHARACTERIZATION OF THE MAIZE GENE SUGARY1, A DETERMINANT OF STARCH COMPOSITION IN KERNELS. *Plant Cell* 7(4): 417-429.
- Kim HU, Wu SSH, Ratnayake C, Huang AHC. 2001. Brassica rapa has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *Plant Physiology* 126(1): 330-341.
- Kirchhoff H. 2013. Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 116(2-3): 481-487.
- Kirchhoff H, Haase W, Wegner S, Danielsson R, Ackermann R, Albertsson PA. 2007. Low-light-induced formation of semicrystalline photosystem II arrays in higher plant chloroplast. *Biochemistry* 46(39): 11169-11176.
- Kirchhoff H, Hall C, Wood M, Herbstova M, Tsabari O, Nevo R, Charuvi D, Shimoni E, Reich Z. 2011. Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(50): 20248-20253.
- Kirchhoff H, Tremmel I, Haase W, Kubitscheck U. 2004. Supramolecular photosystem II organization in grana thylakoid membranes: Evidence for a structured affangement. *Biochemistry* 43(28): 9204-9213.
- Kivimaenpaa M, Sutinen S, Karlsson PE, Sellden G. 2003. Cell structural changes in the needles of Norway spruce exposed to long-term ozone and drought. *Annals of Botany* 92(6): 779-793.
- Kordyum E, Klimenko E. 2013. Chloroplast ultrastructure and chlorophyll performance in the leaves of heterophyllous *Nuphar lutea* (L.) Smith. plants. *Aquatic Botany* 110: 84-91.
- Kosvancova M, Urban O, Sprtova M, Hrstka M, Kalina J, Tomaskova I, Spunda V, Marek MV. 2009. Photosynthetic induction in broadleaved *Fagus sylvatica* and coniferous *Picea abies* cultivated under ambient and elevated CO₂ concentrations. *Plant Science* 177(2): 123-130.
- Kouril R, Wientjes E, Bultema JB, Croce R, Boekema EJ. 2013. High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1827(3): 411-419.
- Kreslavski V, Tatarinzev N, Shabnova N, Semenova G, Kosobryukhov A. 2008. Characterization of the nature of photosynthetic recovery of wheat seedlings

- from short-term dark heat exposures and analysis of the mode of acclimation to different light intensities. *Journal of Plant Physiology* 165(15): 1592-1600.
- Kubinova 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(258): 165-173.
- Kubinova L, Kutik J. 2007. Surface density and volume density measurements of chloroplast thylakoids in maize (*Zea mays* L.) under chilling conditions. *Photosynthetica* 45(4): 481-488.
- Kubinova Z, Janacek J, Lhotakova Z, Kubinova L, Albrechtova J. 2014. Unbiased estimation of chloroplast number in mesophyll cells: advantage of a genuine three-dimensional approach. *Journal of Experimental Botany* 65(2): 609-620.
- Kubínová L, Albrechtová J. 1999. *Stereology in plant anatomy*.
- Kupper P, Sellin A, Klimankova Z, Pokorny R, Puertolas J. 2006. Water relations in Norway spruce trees growing at ambient and elevated CO₂ concentrations. *Biologia Plantarum* 50(4): 603-609.
- Kutik J, Hola D, Kocova M, Rothova O, Haisel D, Wilhelmova N, Ticha I. 2004. Ultrastructure and dimensions of chloroplasts in leaves of three maize (*Zea mays* L.) inbred lines and their F-1 hybrids grown under moderate chilling stress. *Photosynthetica* 42(3): 447-455.
- Kutik J, Kocova M, Hola D, Kornerova M. 1999. The development of chloroplast ultrastructure and Hill reaction activity during leaf ontogeny in different maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Photosynthetica* 36(4): 497-507.
- Kutik J, Tageeva SV, Popov VI. 1981. THE DEVELOPMENT OF CHLOROPLAST ULTRASTRUCTURE DURING THE ONTOGENY OF TILIA-CORDATA MILL LEAVES. *Photosynthetica* 15(2): 261-263.
- Langenkamper G, Manac'h N, Broin M, Cuine S, Becuwe N, Kuntz M, Rey P. 2001. Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species. *Journal of Experimental Botany* 52(360): 1545-1554.
- Leakey ADB, Xu F, Gillespie KM, McGrath JM, Ainsworth EA, Ort DR. 2009. Genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(9): 3597-3602.
- Lhotakova Z, Urban O, Dubankova M, Cvikrova M, Tomaskova I, Kubinova L, Zvara K, Marek MV, Albrechtova J. 2012. The impact of long-term CO₂ enrichment on sun and shade needles of Norway spruce (*Picea abies*): photosynthetic performance, needle anatomy and phenolics accumulation. *Plant Sci* 188-189: 60-70.
- Liang KM, Lin ZF, Ren H, Liu N, Zhang QM, Wang J, Wang ZF, Guan LL. 2010. Characteristics of sun- and shade-adapted populations of an endangered plant *Primulina tabacum* Hance. *Photosynthetica* 48(4): 494-506.
- Lipavska H, Svobodova H, Albrechtova J. 2000. Annual dynamics of the content of non-structural saccharides in the context of structural development of vegetative buds of Norway spruce. *Journal of Plant Physiology* 157(4): 365-373.
- Liu JJJ, Krenz DC, Galvez AF, de Lumen BO. 1998. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Science* 134(1): 11-20.

- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants face the future. *Annual Review of Plant Biology* 55: 591-628.
- Lutz C, Engel L. 2007. Changes in chloroplast ultrastructure in some high-alpine plants: adaptation to metabolic demands and climate? *Protoplasma* 231(3-4): 183-192.
- Marek M, V. 2011. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*.
- Matyssek R, Wieser G, Calfapietra C, de Vries W, Dizengremel P, Ernst D, Jolivet Y, Mikkelsen TN, Mohren GMJ, Le Thiec D, Tuovinen JP, Weatherall A, Paoletti E. 2012. Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. *Environmental Pollution* 160: 57-65.
- Medlyn BE, Barton CVM, Broadmeadow MSJ, Ceulemans R, De Angelis P, Forstreuter M, Freeman M, Jackson SB, Kellomaki S, Laitat E, Rey A, Roberntz P, Sigurdsson BD, Strassmeyer J, Wang K, Curtis PS, Jarvis PG. 2001. Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytologist* 149(2): 247-264.
- Mullineaux CW, Emlin-Jones D. 2005. State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *Journal of Experimental Botany* 56(411): 389-393.
- Mulo P, Sirpio S, Suorsa M, Aro EM. 2008. Auxiliary proteins involved in the assembly and sustenance of photosystem II. *Photosynthesis Research* 98(1-3): 489-501.
- Munne-Bosch S, Jubany-Mari T, Alegre L. 2001. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant Cell and Environment* 24(12): 1319-1327.
- Musser RL, Thomas SA, Wise RR, Peeler TC, Naylor AW. 1984. CHLOROPLAST ULTRASTRUCTURE, CHLOROPHYLL FLUORESCENCE, AND PIGMENT COMPOSITION IN CHILLING-STRESSED SOYBEANS. *Plant Physiology* 74(4): 749-754.
- Mustardy L, Buttle K, Steinbach G, Garab G. 2008. The Three-Dimensional Network of the Thylakoid Membranes in Plants: Quasihelical Model of the Granum-Stroma Assembly. *Plant Cell* 20(10): 2552-2557.
- Mustardy L, Garab G. 2003. Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place. *Trends in Plant Science* 8(3): 117-122.
- Navarro A, Banon S, Olmos E, Sanchez-Blanco MJ. 2007. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science* 172(3): 473-480.
- Niinemets U. 2010. Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management* 260(10): 1623-1639.
- Norby RJ, Warren JM, Iversen CM, Medlyn BE, McMurtrie RE. 2010. CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(45): 19368-19373.
- Nátr L. 2000. *Koncentrace CO₂ a rostliny*.
- Oguchi R, Hikosaka K, Hiura T, Hirose T. 2008. Costs and benefits of photosynthetic light acclimation by tree seedlings in response to gap formation. *Oecologia* 155(4): 665-675.
- 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(5): 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(3): 437-446.
- Olmos E, Sanchez-Blanco MJ, Ferrandez T, Alarcon JJ. 2007. Subcellular effects of drought stress in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Biology* 9(1): 77-84.
- Paakkonen E, Holopainen T, Karenlampi L. 1997. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth) in relation to ambient levels of ozone in Finland. *Environmental Pollution* 96(2): 117-127.
- Paolillo DJ. 1970. 3-DIMENSIONAL ARRANGEMENT OF INTERGRANAL LAMELLAE IN CHLOROPLASTS. *Journal of Cell Science* 6(1): 243-&.
- Pazourek J. 1966. Anatomical gradients. *Acta Univ. Carol.-Biol.*: 7.
- Perktold A, Zellnig G, Guttenberger H, Gailhofer M. 1998. 3D reconstruction of chloroplasts and their ultrastructure using ultra-thin-serial-sections. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 38(1): 159-165.
- Pinkard EA, Beadle CL, Mendham DS, Carter J, Glen M. 2010. Determining photosynthetic responses of forest species to elevated CO₂ : Alternatives to FACE. *Forest Ecology and Management* 260(8): 1251-1261.
- Pokorny R, Salanska P, Janous D. 2001. Growth and transpiration of Norway spruce trees under atmosphere with elevated CO₂ concentration. *Ekologia-Bratislava* 20(1): 14-28.
- Pretzsch H, Schutze G. 2009. Transgressive overyielding in mixed compared with pure stands of Norway spruce and European beech in Central Europe: evidence on stand level and explanation on individual tree level. *European Journal of Forest Research* 128(2): 183-204.
- 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(4): 461-471.
- Reboredo F. 2012. Zinc compartmentation in *Halimione portulacoides* (L.) Aellen and some effects on leaf ultrastructure. *Environmental Science and Pollution Research* 19(7): 2644-2657.
- Rochaix JD. 2011. Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1807(3): 375-383.
- Rozak PR, Seiser RM, Wacholtz WF, Wise RR. 2002. Rapid, reversible alterations in spinach thylakoid appression upon changes in light intensity. *Plant Cell and Environment* 25(3): 421-429.
- Rumak I, Mazur R, Gieczewska K, Koziol-Lipinska J, Kierdaszuk B, Michalski WP, Shiell BJ, Venema JH, Vredenberg WJ, Mostowska A, Garstka M. 2012. Correlation between spatial (3D) structure of pea and bean thylakoid membranes and arrangement of chlorophyll-protein complexes. *Bmc Plant Biology* 12: 18.
- Saco D, Martin S, San Jose P. 2013. Vanadium distribution in roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*: morphological and ultrastructural effects. *Biologia Plantarum* 57(1): 128-132.
- Sage RF. 1994. ACCLIMATION OF PHOTOSYNTHESIS TO INCREASING ATMOSPHERIC CO₂ - THE GAS-EXCHANGE PERSPECTIVE. *Photosynthesis Research* 39(3): 351-368.
- Sarafis V. 1998. Chloroplasts: a structural approach. *Journal of Plant Physiology* 152(2-3): 248-264.

- Saxe H, Ellsworth DS, Heath J. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytologist* 139(3): 395-436.
- Schroder WP, Petit PX. 1992. FLOW-CYTOOMETRY OF SPINACH-CHLOROPLASTS - DETERMINATION OF INTACTNESS AND LECTIN-BINDING PROPERTIES OF THE ENVELOPE AND THE THYLAKOID MEMBRANES. *Plant Physiology* 100(3): 1092-1102.
- Senser M, Schotz F, Beck E. 1975. SEASONAL-CHANGES IN STRUCTURE AND FUNCTION OF SPRUCE CHLOROPLASTS. *Planta* 126(1): 1-10.
- Shao QS, Wang HZ, Guo HP, Zhou AC, Huang YQ, Sun YL, Li MY. 2014. Effects of Shade Treatments on Photosynthetic Characteristics, Chloroplast Ultrastructure, and Physiology of *Anoectochilus roxburghii*. *Plos One* 9(2): 10.
- Shimoni E, Rav-Hon O, Ohad I, Brumfeld V, Reich Z. 2005. Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* 17(9): 2580-2586.
- Slavik B. 1963. The Distribution Pattern of Transpiration Rate, Water Saturation Deficit, Stomata Number and Size, Photosynthetic and Respiration Rate in the Area of the Tobacco Leaf Blade. *Biologia Plantarum* 5(2): 10.
- Smith AR, Lukac M, Bambrick M, Miglietta F, Godbold DL. 2013. Tree species diversity interacts with elevated CO₂ to induce a greater root system response. *Global Change Biology* 19(1): 217-228.
- Souza VL, de Almeida AAF, Souza JD, Mangabeira PAO, de Jesus RM, Pirovani CP, Ahnert D, Baligar VC, Loguercio LL. 2014. Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 21(2): 1217-1230.
- Staehelin LA. 2003. Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 76(1-3): 185-196.
- Stefanowska M, Kuras M, Kacperska A. 2002. Low temperature-induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) leaves. *Annals of Botany* 90(5): 637-645.
- Sun ZP, Li TL, Liu YL. 2011. Effects of elevated CO₂ applied to potato roots on the anatomy and ultrastructure of leaves. *Biologia Plantarum* 55(4): 675-680.
- Tageeva SV, Kutik J, Popov VI. 1981. THE DEVELOPMENT OF CHLOROPLAST ULTRASTRUCTURE DURING THE ONTOGENY OF LARIX-EUROPAEA LAM ET DC NEEDLES. *Photosynthetica* 15(2): 258-260.
- Taiz, Lincoln, Zeiger, Eduardo. 2006. *Plant physiology*.
- 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(1): 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(2): 343-354.
- Terashima I, Yanagisawa S, Sakakibara H. 2014. Plant Responses to CO₂: Background and Perspectives (vol 55, pg 237, 2014). *Plant and Cell Physiology* 55(3): 666-666.
- Thomson WW, Platt K. 1973. PLASTID ULTRASTRUCTURE IN BARREL CACTUS, ECHINOCACTUS-ACANTHODES. *New Phytologist* 72(4): 791-&.
- Tomimatsu H, Tang YH. 2012. Elevated CO₂ differentially affects photosynthetic induction response in two *Populus* species with different stomatal behavior. *Oecologia* 169(4): 869-878.

- Urban O. 2003. Physiological impacts of elevated CO₂ concentration ranging from molecular to whole plant responses. *Photosynthetica* 41(1): 9-20.
- 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(3): 395-401.
- Utriainen J, Holopainen T. 2001. Influence of nitrogen and phosphorus availability and ozone stress on Norway spruce seedlings. *Tree Physiology* 21(7): 447-456.
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A. 1999. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends in Plant Science* 4(6): 232-235.
- Vičanková A. 1998. *Vývoj chloroplastů v buňkách pochev cévních svazků třetího listu kukuřice seté (Zea mays L.)*.
- Votrubová, Olga. 2011. *Anatomie rostlin*.
- Wang XZ, Anderson OR, Griffin KL. 2004. Chloroplast numbers, mitochondrion numbers and carbon assimilation physiology of *Nicotiana sylvestris* as affected by CO₂ concentration. *Environmental and Experimental Botany* 51(1): 21-31.
- Weier TE, Drever H, Thomson WW, Stocking CR. 1963. GRANA AS STRUCTURAL UNITS IN CHLOROPLASTS OF MESOPHYLL OF *NICOTIANA RUSTICA* AND *PHASEOLUS VULGARIS*. *Journal of Ultrastructure Research* 8(1): 122-&.
- Wiebel ER. 1979. *Stereological methods*.
- Wildman SG, Hirsch AM, Kirchanski SJ, Spencer D. 2004. Chloroplasts in living cells and the string-of-grana concept of chloroplast structure revisited. *Photosynthesis Research* 80(1-3): 345-352.
- Xu QA, Paulsen AQ, Guikema JA, Paulsen GM. 1995. FUNCTIONAL AND ULTRASTRUCTURAL INJURY TO PHOTOSYNTHESIS IN WHEAT BY HIGH-TEMPERATURE DURING MATURATION. *Environmental and Experimental Botany* 35(1): 43-54.
- Yang YP, Juang YS, Hsu BD. 2002. A quick method for assessing chloroplastic starch granules by flow cytometry. *Journal of Plant Physiology* 159(1): 103-106.
- Yano S, Terashima I. 2001. Separate localization of light signal perception for sun or shade type chloroplast and palisade tissue differentiation in *Chenopodium album*. *Plant and Cell Physiology* 42(12): 1303-1310.
- Yelle S, Beeson RC, Trudel MJ, Gosselin A. 1989. ACCLIMATION OF 2 TOMATO SPECIES TO HIGH ATMOSPHERIC CO₂ .1. SUGAR AND STARCH CONCENTRATIONS. *Plant Physiology* 90(4): 1465-1472.
- Ytterberg AJ, Peltier JB, van Wijk KJ. 2006. Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiology* 140(3): 984-997.
- Zechmann B, Zellnig G. 2009. Microwave-assisted rapid plant sample preparation for transmission electron microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford* 233(2): 258-268.
- Zellnig G, Perktold A, Zechmann B. 2010. Fine structural quantification of drought-stressed *Picea abies* (L.) organelles based on 3D reconstructions. *Protoplasma* 243(1-4): 129-136.
- Zellnig G, Zechmann B, Perktold A. 2004. Morphological and quantitative data of plastids and mitochondria within drought-stressed spinach leaves. *Protoplasma* 223(2-4): 221-227.
- Zhao HX, Li YP, Zhang XL, Korpelainen H, Li CY. 2012. Sex-related and stage-dependent source-to-sink transition in *Populus cathayana* grown at elevated CO₂ and elevated temperature. *Tree Physiology* 32(11): 1325-1338.

Internetové zdroje:

<http://www.yourarticlelibrary.com/plastids/plastids-important-kinds-of-plastids-1378-words/6309/>

<http://www.botanika-puchnerova.estranky.cz/fotoalbum/fotosynteza/calvinuv-cyklus.jpg.html>

<http://www.tzb-info.cz/6123-emise-co2-v-souvislostech>

<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>

<http://www.czechglobe.cz/>

<http://climatechangescience.ornl.gov/content/free-air-co2-enrichment-face-experiment>

<http://www.bnl.gov/face/>

<http://www.igb.illinois.edu/soyface/>

<http://www.uws.edu.au/hie/facilities/face>

<http://face.env.duke.edu/>

<http://aspenface.mtu.edu/>