

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biologie  
Učitelství biologie pro střední školy



**Bc. Natália Glanc**

**Ultrastruktura chloroplastů smrku ztepilého**  
**- heterogenita v rámci jehlice**

Norway spruce chloroplast ultrastructure  
- heterogeneity within a needle

**Diplomová práce**

Školitelka: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Praha, 2016

**Školitelka diplomové práce:** Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.  
**Konzultantky diplomové práce:** Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.  
RNDr. Barbora Radochová, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D., za konzultace prof. Jany Albrechtové, Ph.D. a RNDr. Barbory Radochové, Ph.D., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 2. května 2016

Natália Glanc

## **Poděkování:**

V první řadě bych ráda poděkovala školitelce Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D, za její vstřícný a vysoce motivační přístup při vedení této diplomové práce, a konzultantkám prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. a RNDr. Barboře Radochové, Ph.D. za přínosné konzultace a cenné poznámky, kterými mě při vytváření této práce navigovaly. Za podporu děkuji i Mgr. Evě Neuwirthové a dalším kolegyním z laboratoře.

Dále děkuji pracovníkům Laboratoře ekologické fyziologie rostlin Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i. za možnost odběru vzorků z experimentálního stanoviště na Bílém Kříži. Práce byla finančně podpořena z projektu GA ČR P501/10/0340 a MŠMT projektu NPU I LO1417.

Poděkování patří i mým rodičům a sourozencům, kteří při mně stáli po celou dobu studia, a zejména pak mému muži Matoušovi.

## Abstrakt

Temperátní lesy, které jsou dlouhodobým úložištěm uhlíku, reagují na zvyšující se koncentraci oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) v ovzduší. Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.) je nejrozšířenějším jehličnatým stromem v lesích České republiky, proto jsem se ve své práci zaměřila na odpověď fotosyntetického aparátu této dřeviny na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub>. Cílem práce bylo vyhodnotit, jak koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňuje ultrastrukturu chloroplastů ve slunných a stinných jehlicích. Vliv koncentrace CO<sub>2</sub> a ozáření byl sledován na poměrném zastoupení škrobu v chloroplastech mezofylových buněk jehlic. Dalším cílem práce bylo otestovat, zda chloroplasty z první vrstvy mezofylu jsou z hlediska kvantifikace škrobu reprezentativní pro celou jehlici.

Pro výzkum byly použity 11 let staré stromy smrku ztepilého, které byly po dobu 6 let vystaveny atmosférické nebo zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> v kultivačních sférách s automaticky ovládanými okny na Experimentálním stanovišti Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech. V říjnu 2011 byly odebrány jehlice 1. ročníku ze stromů vystavených běžné atmosférické koncentraci (382-395ppm) a zvýšené koncentraci (700ppm) CO<sub>2</sub>. Z jehlic byly připraveny ultratenké řezy a mediánní řezy chloroplastů byly nasnímány pod transmisním elektronovým mikroskopem. Pro vyhodnocení poměrného zastoupení škrobu byla použita stereologická metoda bodové mřížky a metoda interaktivní segmentace. Tyto metody se projeví jako zastupitelné.

Pro vyhodnocení obsahu škrobu byly vybírány chloroplasty z první vrstvy mezofylu pod pokožkou a z celé plochy mezofylu pomocí metody systematicky rovnoměrně náhodného výběru (SRN). V případě měření plochy chloroplastu na řezu se potvrdilo, že chloroplasty z první vrstvy mezofylu jsou reprezentativní pro celou jehlici. Při měření plochy škrobových zrn a poměrného zastoupení škrobu byly chloroplasty z první vrstvy mezofylu reprezentativní pro celou jehlici s výjimkou slunných jehlic bez ošetření CO<sub>2</sub>, u kterých chloroplasty z první vrstvy mezofylu vykazovaly méně škrobu, než chloroplasty vybrané metodou SRN.

Na velikost chloroplastu a škrobových zrn měly vliv oba sledované vnější faktory, silnější efekt však měla ozáření. Bez ohledu na koncentraci CO<sub>2</sub> byl podíl škrobu vyšší ve slunných jehlicích, než ve stinných. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňovala zejména četnost chloroplastů obsahujících škrob. Více jak polovina chloroplastů jehlic rostoucích při atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub> neobsahovala žádná

škrobová zrna, zatímco většina chloroplastů slunných jehlic ošetřených CO<sub>2</sub> obsahovala alespoň jedno škrobové zrno.

### **Klíčová slova:**

smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.), chloroplast, škrobové zrno, zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, ozářenost, jehlice, první vrstva mezofylu pod pokožkou, systematicky rovnoměrně náhodný výběr, stereologické metody

# Abstract

Temperate forests serve as long term carbon storage and are affected by increasing carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) concentration in the atmosphere. Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) is the most abundant conifer in the forests of the Czech Republic, therefore I studied the response of its photosynthetic apparatus to elevated CO<sub>2</sub> concentration. The aim of my thesis was to analyze the impact of CO<sub>2</sub> concentration on chloroplast ultrastructure in both shaded and exposed needles, focusing on the volume density of starch in the median cross-sections of mesophyll cell chloroplasts. The next aim of the study was to test whether the chloroplasts of the first subepidermal layer of mesophyll are representative for the whole needle with respect to starch volume density.

The study was performed on eleven years-old Norway spruce trees that had been exposed to ambient or elevated concentration of CO<sub>2</sub> for six years; the experiment had been carried out at the Bílý Kříž experimental station in the Beskids Mountains in cultivation chambers with automatically adjustable windows. First year needles of trees grown under ambient (382-395ppm) or elevated (700 ppm) CO<sub>2</sub> concentration were collected in October 2011. The needles were used to prepare ultrathin sections and the images of median chloroplast cross-sections were acquired under a transmission electron microscope. Starch volume density was analyzed using the point-grid stereological method and the interactive segmentation method; both methods turned out to provide identical results.

The chloroplasts for starch content analysis were selected from the first subepidermal mesophyll layer or from the whole mesophyll with the systematic uniform random sampling. I confirmed that the chloroplast area in the first subepidermal mesophyll layer is representative of the whole needle. In case of starch grain area and starch volume density, the first subepidermal mesophyll layer was representative of the whole needle in all samples except the exposed needles at ambient CO<sub>2</sub> concentration, where starch volume density was lower compared to the chloroplasts selected with the systematic uniform random sampling.

Both observed environmental factors studied affected the size of chloroplasts and starch grains; however, the effect of irradiation was stronger. Starch was more abundant in exposed needles regardless of CO<sub>2</sub> concentration, which affected mostly the amount

of chloroplasts containing starch. More than a half of the chloroplasts from needles grown at ambient concentration of CO<sub>2</sub> did not contain any starch grains, while most chloroplasts of exposed, CO<sub>2</sub>-treated needles contained at least one starch grain.

**Key words:**

Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.), chloroplast, starch grain, elevated CO<sub>2</sub> concentration, irradiation, needle, first subepidermal layer of mesophyll, systematic uniform random sampling, stereological methods

# Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
Obsah .....	8
Seznam použitých zkratk: .....	10
1. Úvod.....	11
1.1. Cíle a hypotézy.....	13
1.1.1. Cíle práce .....	13
1.1.2. Hypotézy .....	13
2. Literární přehled .....	14
2.1. Stavba jehlice na úrovni pletiv .....	14
2.1.1. Vliv ozáření na stavbu jehlice .....	16
2.1.2. Vliv koncentrace CO <sub>2</sub> na stavbu jehlice .....	18
2.2. Ultrastruktura chloroplastů.....	21
2.2.1. Vliv vybraných faktorů na počet, velikost a ultrastrukturu chloroplastů .	24
2.3. Asimilační škrob a jeho funkce.....	27
2.3.1. Vliv ozáření na fotosyntézu a obsah asimilačního škrobu v chloroplastech .....	28
2.3.2. Vliv CO <sub>2</sub> na obsah asimilačního škrobu v chloroplastech .....	31
2.3.3. Roční dynamika obsahu asimilačního škrobu .....	33
2.4. Vliv dalších faktorů na stavbu jehlice a ultrastrukturu chloroplastů.....	36
2.4.1. Dostupnost vody .....	36
2.4.2. Okyselení půdy .....	37
2.4.3. Alkalizace půdy .....	38
2.4.4. Vliv koncentrace O <sub>3</sub> .....	40
2.5. Metody zjišťování obsahu škrobu v chloroplastech.....	42
2.5.1. Využití mikroskopických technik.....	42
2.5.2. Vyhodnocení ultrastruktury chloroplastu .....	43
2.5.2.1. Stereologická metoda bodová.....	43
2.5.2.2. Metody analýzy obrazu .....	44
2.5.2.2.1. Automatické prahování struktur.....	44
2.5.2.2.2. Interaktivní segmentace struktur .....	44
3. Materiál a metody .....	45



3.1.	Odběr materiálu.....	45
3.2.	Metody .....	47
3.2.1.	Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii .....	47
3.2.2.	Metody výběru chloroplastů pro měření.....	50
3.2.2.1.	Metoda výběru chloroplastů z celé plochy příčného řezu .....	50
3.2.2.2.	Metoda výběru chloroplastů z první vrstvy mezofylu pod pokožkou.....	50
3.2.3.	Vyhodnocení zastoupení škrobu pomocí stereologické metody bodové mřížky .....	52
3.2.4.	Vyhodnocení zastoupení škrobu pomocí metody interaktivní segmentace .....	54
3.3.	Statistika.....	54
4.	Výsledky .....	56
4.1.	Optimalizace metod pro kvantifikaci ultrastruktury chloroplastů .....	56
4.2.	Reprezentativnost první vrstvy mezofylu pod pokožkou pro kvantifikaci škrobu.....	58
4.3.	Poměrné zastoupení chloroplastů se škrobovými zrny vztahované k jednotlivým stromům .....	60
4.4.	Vyhodnocení vlivu ozáření a koncentrace CO <sub>2</sub> v ovzduší na ultrastrukturu chloroplastů.....	62
5.	Diskuse.....	66
5.1.	Metodika .....	66
5.1.1.	Experimentální systémy.....	66
5.1.2.	Metody pro kvantifikaci škrobu na snímcích z elektronové mikroskopie .....	68
5.2.	Reprezentativnost první vrstvy mezofylu z hlediska kvantifikace škrobu.....	70
5.3.	Vliv ozáření na velikost chloroplastů a obsah asimilačního škrobu.....	71
5.4.	Vliv koncentrace CO <sub>2</sub> v ovzduší na velikost chloroplastů a obsah asimilačního škrobu.....	74
5.5.	Význam studia vlivu CO <sub>2</sub> na dřeviny.....	78
6.	Závěr .....	80
7.	Literatura.....	82
7.1.	Internetové zdroje: .....	90

## Seznam použitých zkratk:

$A_{\max}$	světlem saturovaná rychlost asimilace CO <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
AFM	mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
$F_v/F_m$	maximální využití fotosystému II
FACE	Free-air carbon enrichment
FIB	metoda fokusovaného iontového svazku (focused ion beam)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
IPCC	Intergovernmental panel on climate change
IS	metoda interaktivní segmentace
LMA	specifická hmotnost listu ( $\text{g m}^{-2}$ )
MBM	metoda bodové mřížky
OTC	růstové komory s otevřenou střechou (open-top chambers)
ppm	miliontina, $10^{-6}$ (parts per million)
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
PSA	analýza velikosti částic (particle size analysis)
Rubisco	ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza-oxygenáza
SLA	specifická plocha listu ( $\text{m}^2\text{kg}^{-1}$ ), (specific leaf area)
SRN	systematicky rovnoměrně náhodný výběr
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
$\Phi_{\text{PSII}}$	efektivní výtěžek elektrotransportního řetězce fotosystému II

# 1. Úvod

Klimatické změny jsou události, kterými se aktuálně zabývá velké množství výzkumů. Děje se tak především z toho důvodu, že jedna z nich probíhá v současné době. Jednou z příčin této klimatické změny je s velkou pravděpodobností zvyšování koncentrace skleníkových plynů v atmosféře (IPCC, 2014). K nejvýznamnějším skleníkovým plynům patří oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ). Zvyšování jeho koncentrace v atmosféře probíhá už od poloviny 19. století, kdy se výrazně proměnilo zemědělství, došlo k industrializaci výroby, změnil se způsob dopravy, a obsah  $\text{CO}_2$  v atmosféře začal prudce stoupat. Tyto jevy zároveň souvisí s tím, že začala celosvětově narůstat lidská populace. Zvyšování obsahu  $\text{CO}_2$  se děje převážně v důsledku lidských činností, zejména kvůli spalování fosilních paliv a změn ve využívání půdy.  $\text{CO}_2$  se jako skleníkový plyn podílí na globálním oteplování, je však nezbytný pro fotosyntézu a rostliny při ní v něm obsažený uhlík zabudovávají do svých pletiv. Současně však rostliny vypouštějí  $\text{CO}_2$  při respiraci,  $\text{CO}_2$  vzniká také při spalování či jiném průmyslovém zpracování rostlinné biomasy. Jelikož dýchání, které uvolňuje  $\text{CO}_2$  do atmosféry, probíhá stále, zatímco pro fotosyntézu je třeba určitých podmínek a snižuje se i pod vlivem stresových faktorů prostředí, existuje tenká hranice mezi tím, zda jsou rostliny sinkem či zdrojem  $\text{CO}_2$ , tedy zda absorbují více  $\text{CO}_2$ , než emitují, nebo naopak. Boreální lesy severní polokoule patří mezi přirozený sink uhlíku a jsou považovány za největší sink mezi biomy (IPCC, 2014). Avšak vzhledem k navyšujícímu se počtu přírodních disturbancí, jako jsou například požáry či činnost hmyzích škůdců, se často boreální lesy stávají naopak zdrojem  $\text{CO}_2$  (Kurz et al., 2008). Podobně by tomu mohlo být u temperátních lesů, které se nacházejí i v České republice. Narůstající četnost disturbancí může vést k poklesu síly sinku temperátních lesů. Z tohoto důvodu můžeme považovat temperátní lesy za největší nejistotu z hlediska ukládání uhlíku na globální úrovni (Bonan, 2008).

Nejrozšířenějším jehličnanem v českých lesích je smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.), díky tomu, že je naší hlavní hospodářsky využívanou dřevinou. To, jakým způsobem se tento jehličnan vyrovnává se zvyšující se koncentrací  $\text{CO}_2$  v ovzduší, je tedy zásadní nejen pro evropské lesy temperátní zóny, ale i lesy boreální, kde je tento druh také ve velké míře zastoupen. Výzkum smrku ztepilého z obou zón je tedy nezbytný pro celkové porozumění problematice ukládání uhlíku ve vegetaci v rámci

terestrického koloběhu uhlíku, v současnosti však většina výzkumů pochází právě z temperátních lesů. Reakce smrku ztepilého na klimatické změny v boreálních lesích jsou prozkoumány méně.

Na to, jakým způsobem bude rostlina reagovat na zvyšující se koncentraci CO<sub>2</sub> v ovzduší, mají vliv i další vnější faktory prostředí. Patří mezi ně například teplota, dostupnost vody, úživnost půdy, a také ozáření (Stinziano a Way, 2014). Množství záření dopadajícího na rostlinu ovlivňuje množství energie, které se přemění na energii chemických vazeb, výrazně tedy ovlivňuje rychlost fotosyntézy a tvorbu biomasy. V rámci koruny dřevin se vytváří gradient v intenzitě ozáření z důvodu vzájemného zastínění větví a listů, tento gradient pak výrazně ovlivňuje tvorbu biomasy. Zkoumání interakcí faktoru ozáření a zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> nám pomůže ke komplexnímu objasnění toho, jakým způsobem se dřeviny vyrovnávají s klimatickými změnami.

Tato diplomová práce byla řešena v rámci projektu GAČR P501/10/0340 s názvem „Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a ozáření na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních“, jehož hlavním řešitelem byla prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D. Na tomto projektu spolupracovalo několik týmů nejen z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, ale také z Oddělení biomatematiky Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. a Laboratoře ekologické fyziologie rostlin Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i. Za Přírodovědeckou fakultu UK v Praze se na výzkumu podílely týmy z Katedry genetiky a mikrobiologie a Katedry experimentální biologie rostlin pod vedením prof. J. Albrechtové. Tato diplomová práce má za cíl obohatit společný projektový výstup o poznatky vlivu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a ozáření na smrk ztepilý, konkrétně na obsah asimilačního škrobu v jehlicích. Přispívá také k řešení metodických problémů při kvantifikaci obsahu asimilačního škrobu za využití transmisní elektronové mikroskopie.

Členění diplomové práce je standardní, nejprve jsou představeny cíle práce a stanovené hypotézy, poté shrnutí poznatků o daném tématu z odborné literatury. Následuje kapitola o původu a výběru materiálu, metodách zpracování vzorků a jejich vyhodnocení, a dále jsou prezentovány výsledky. Diskuse reflektuje získaná data s výsledky z odborné literatury, v závěrečné kapitole jsou poté shrnuty zásadní výstupy a úspěšnost celé práce.

## **1.1. Cíle a hypotézy**

### **1.1.1.Cíle práce**

- 1) Určit, zda první vrstva mezofylu pod pokožkou jehlice je pro kvantifikaci škrobu reprezentativní pro celou jehlici.
- 2) Vyhodnotit vliv ozářenosti a různé koncentrace CO<sub>2</sub> na poměrné zastoupení škrobu na mediánním řezu chloroplastu v mezofylu jehlice smrku ztepilého.

### **1.1.2.Hypotézy**

Na základě nastudované literatury byly vytvořeny hypotézy, ze kterých výzkum této diplomové práce vychází:

- 1) První vrstva mezofylu je reprezentativní pro celou jehlici z hlediska kvantifikace škrobu v chloroplastech.
- 2) V jehlicích stromů rostoucích při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> je obsah škrobu vyšší, než při běžné koncentraci CO<sub>2</sub> v ovzduší.
- 3) Ve slunných jehlicích je na mediánním řezu chloroplastem vyšší poměrné zastoupení škrobu, než ve stinných.

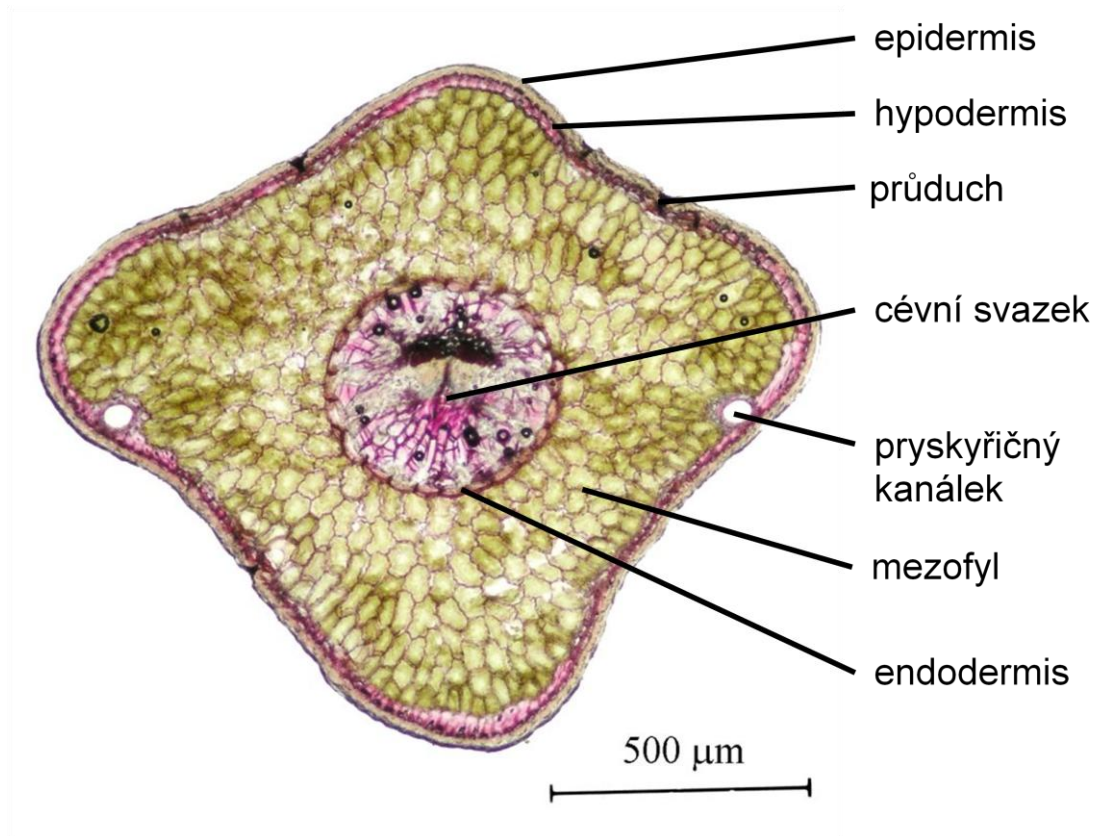
## 2. Literární přehled

### 2.1. Stavba jehlice na úrovni pletiv

Jehlice je asimilační orgán většiny nahosemenných dřevin. V případě smrku ztepilého jde o ekvifaciální list, kdy si je abaxiální a adaxiální strana morfologicky i anatomicky podobná. V mnoha ohledech je jehlice smrku ztepilého list s xeromorfní adaptací, je tedy přizpůsoben prostředí s nižší vlhkostí. Na povrchu jehlice nacházíme pokožku, tzv. epidermis (Obr. 2.1). Ta vzniká z embryonálního protodermu a tvoří ji většinou jedna vrstva buněk. Na povrchu epidermis je silná vrstva kutikuly a vosků. Pokožka nenese žádné trichomy, průduchy jsou v ní hluboce zanořené. Takovéto adaptace pomáhají stálezeleným jehličnanům překonat období chladu a mrazu, kdy má rostlina omezený přísun vody (Votrubová, 2011). Pod pokožkou se nachází jedna či dvě mechanicky důležité vrstvy hypodermis, tvořené sklerenchymatickými buňkami. Pletivo mezofyl, které tvoří buňky s asimilační funkcí parenchymatického původu, většinou zastupuje největší podíl objemu jehlice. Většina jehličnanů, včetně smrku ztepilého, má v jehlicích nerozlišený mezofyl, některé druhy (jedle bělokora (*Picea alba* Mill.), douglaska tisolistá (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*), tis červený (*Taxus baccata* L.), aj.) však mají mezofyl rozlišený na houbovitý a palisádový parenchym (Evert, 2006). Buňky mezofylu smrku ztepilého jsou nepravidelného tvaru a mají mezi sebou velké mezibuněčné prostory, které mohou zaujímat až 30 % objemu mezofylu (Lhotáková et al., 2008). Díky tomu se vytváří vnitřní povrch listu, kde dochází k výměně plynů mezi vnějším prostředím a buňkami. Buňky mezofylu obsahují velké množství chloroplastů. V kvantitativní studii prováděné na stejném materiálu smrku ztepilého, využívající nevyčýlenou stereologickou metodu disektor, jich bylo napočítáno až přes 200 (Kubínová et al., 2014). Chloroplasty jsou stěžejním centrem pro fotosyntézu. Strukturální parametry, jako například zastoupení mezofylu v jehlici, počet a velikost jeho buněk, či fyziologické parametry podmíněné strukturou, jako je vodivost CO<sub>2</sub> (g<sub>m</sub>), ovlivňují rychlost fotosyntézy a asimilace CO<sub>2</sub>. Stejně tak je pro tyto procesy důležitý počet, velikost a vnitřní uspořádání chloroplastů, proto bude kapitola 2.2 věnovaná ultrastruktuře těchto organel.

Na rozhraní hypodermis a mezofylu se nachází jeden až dva pryskyřičné kanálky tvořené dvěma vrstvami buněk. Sklerenchymatická vnější vrstva má mechanickou funkci, vnitřní vrstvu tvoří parenchymatické buňky, které vylučují pryskyřici. Uprostřed

jehlice se nachází střední válec, který obsahuje vodivá pletiva a je ohraničen vrstvou endodermis s mechanickou funkcí (Soukupová et al., 2000). Počet cévních svazků je druhově specifický, jehlicí smrku ztepilého prochází jeden kolaterální cévní svazek.



Obr. 2.1 Snímek anatomické stavby jehlice smrku ztepilého na mediáním řezu. Snímáno ze světelného mikroskopu, typu světlé pole; růžové lignifikované struktury jsou histochemicky detekovány fluoroglucinolem. Autor: Zuzana Lhotáková

### 2.1.1. Vliv ozáření na stavbu jehlice

Ozáření a koncentrace CO<sub>2</sub> jsou dva významné faktory, které ovlivňují morfologii i anatomii jehlice. Vnější i vnitřní stavba jehlice má pak vliv na absorpci světla, účinnost využití vody, výměnu plynů a fixaci uhlíku (Woodruff et al., 2009).

Mezofyl svou stavbou odpovídá na dopadající sluneční záření rozdílně u různých druhů, což vysvětluje mezidruhové rozdíly ve fotosyntetické aktivitě (Niinemets et al., 2007). U velkého množství druhů je při nárůstu tloušťky jehlice pozorován nárůst mezofylu, většinou na úkor epidermis, což umožňuje zvýšení fotosyntetické kapacity (Niinemets, 1999). Reakce na zvýšenou ozáření je různá u listů a jehlic, zakládá se však na podobných principech. Listy rostoucí při různé ozáření se většinou liší v tloušťce a velikosti vnějšího povrchu, jehlice zase v délce a tvaru na příčném řezu. Výzkumy ukázaly, že se zvyšující se ozáření jsou jehlice delší, narůstá i jejich tloušťka (Niinemets et al., 2007).

Ozáření má pozitivní vliv na specifickou hmotnost listu (množství sušiny na jednotku plochy - LMA) (Niinemets et al., 2006). Studie ukázaly, že jehlice smrku ztepilého, které se nacházely ve vyšších patrech koruny a byly tedy vystaveny vyššímu ozáření, byly delší a měly větší projekční plochu, než stejně staré jehlice odebrané z nižších pater koruny téhož stromu. Zároveň však měly výše položené jehlice menší specifickou listovou plochu (SLA- specifická listová plocha na jednotku sušiny;  $SLA=1/LMA$ ), než jehlice ze spodních pater (Pokorný et al., 2011). Právě specifická listová plocha ovlivňuje množství světla, které může být zachyceno a využito při fotosyntéze (Evans a Poorter, 2001). Částečně protichůdné výsledky však přinesl výzkum douglasky tisolisté (Woodruff et al., 2009). Ve vyšších patrech stromu se nacházely kratší jehlice s menší plochou, ale naopak s větší tloušťkou, než v nižších patrech stromu. Tloušťka mezofylu na řezu, tedy vzdálenost mezi endodermis a epidermis, se s rostoucí ozáření zvyšovala, vodivost mezofylu a asimilace CO<sub>2</sub> se naopak snižovala. Tyto výsledky byly vysvětlovány hydraulickým odporem, tedy sníženým vodním potenciálem ve vyšších patrech stromu (Woodruff et al., 2009). Pokorný et al. (2011) vztah vodního potenciálu a výšky stromu nediskutují.

Co se týče vlivu ozáření na tvar jehlice, přímá závislost se u smrku ztepilého nepotvrdila. Jehlice z různých pater koruny stromů se od sebe nepatrně lišily, nebyly však pozorovány jednoznačné trendy (Pokorný et al., 2011).



Reakce rostlin na ozáření je popsána i u listnatých stromů. Niinemets (1997) porovnával vliv zastínění na velikost listu u 4 druhů listnatých stromů - dub letní (*Quercus robur* L.), topol osika (*Populus tremula* L.), střemcha obecná (*Prunus padus* L.) a javor mléč (*Acer platanoides* L.). LMA se u všech sledovaných druhů zvyšovala lineárně s ozářeností (Niinemets, 1997). Stejnou závislost popisují další výzkumy na 5 druzích listnatých stromů - topol osika, líska obecná (*Corylus avellana* L.), jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.), buk lesní (*Fagus sylvatica* L.) a lípa srdčitá (*Tilia cordata* Mill.) (Niinemets a Kull, 1998). Stínomilné druhy přitom vykazovaly menší míru adaptace při vysokém ozáření. Nárůst tloušťky listu ve vyšších patrech koruny byl však pravděpodobně limitován dalšími faktory prostředí. Může mezi ně patřit i nedostatek vody, který často provází zvýšenou míru transpirace při vyšší ozářenosti, a je tedy limitující pro expanzi buněk a tím i růst listu (Niinemets a Kull, 1998). Evans a Poorter (2001) měřili závislost specifické listové plochy na ozáření u 10 druhů dvouděložných rostlin s C3 typem metabolismu. Listy rostlin vystavené vysoké ozářenosti měly menší listovou plochu. Byly však tlustší, měly větší počet chloroplastů a fotosyntetických enzymů, a vykazovaly proto větší fotosyntetickou aktivitu na jednotku plochy listu. Z výzkumu tedy vyplynulo, že míru absorpce neovlivňuje specifická listová plocha, ale množství chlorofylu na jednotku listové sušiny (Evans a Poorter, 2001).

Jehlice reagují na míru ozářenosti i na anatomické úrovni (Niinemets, 1999; Niinemets et al., 2007). Niinemets et al. (2007) porovnávali změny v objemu mezofylu při aklimaci na různou ozářenost u dvou druhů borovic (*Pinus patula* Schlecht. & Cham. a *Pinus radiata* D. Don.). Zvýšení ozářenosti nad průměrnou sezónní hladinu vedlo k nárůstu tloušťky a šířky jehlice. Poměr objemu jehlice k její celkové ploše se při vyšším ozáření zvětšil, objem buněk mezofylu pozitivně koreloval s ozářením. Zároveň se snížil objem vrstvy hypodermis a epidermis, což potvrzuje výsledky předchozích výzkumů (Niinemets, 1999). Objem vrstvy mezofylu se při zvýšené ozářenosti navýšil u obou druhů, u *Pinus patula* však výrazněji, než u *Pinus radiata*. To poukazuje na mezidruhovou variabilitu ve fotosyntetické kapacitě jehlice (Niinemets et al., 2007).

Reakce rostliny na zvýšenou ozářenost je druhově specifická a závisí na dalších faktorech (např. dostupnost vody). Ve většině nastudovaných prací však mají jehlice či listy ve vyšších patrech koruny stromů větší tloušťku, vyšší hmotnost sušiny

na plochu a objem, větší počet buněk mezofylu a jeho tloušťku. Naopak délka, šířka a plocha jehlice či listu se snižuje s mírou ozáření. Takovéto anatomické změny umožňují efektivně přijímat sluneční záření a lépe tak využít fotosyntetické kapacity rostliny (Niinemets, 1997; Niinemets et al., 2007; Woodruff et al., 2009; Raeim et al., 2012).

### **2.1.2. Vliv koncentrace CO<sub>2</sub> na stavbu jehlice**

Oxid uhličitý je pro rostlinu nezbytný plyn. Váže se ve stromatu chloroplastů při sekundární fázi fotosyntézy, je tedy důležitým substrátem pro tvorbu sacharidů a dalších organických látek. Nárůst jeho koncentrace v ovzduší je dlouhodobě trvající trend, na který rostliny reagují a dokážou ho aktivně využít. U rostlin s C<sub>3</sub> typem metabolismu, které jsou vystaveny vyšší koncentraci CO<sub>2</sub>, se projevuje jeho rychlejší asimilace a také nižší míra fotorespirace (Marek, 2011).

V listech probíhají dva zásadní děje – fotosyntéza a transpirace. Morfologická a anatomická stavba listu může ovlivnit míru a rychlost fixace CO<sub>2</sub> a tedy tvorby asimilátů. Lze se tedy domnívat, že se koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší odrazí na vnitřní i vnější stavbě jehlice. Je však pravděpodobné, že kromě dostupnosti CO<sub>2</sub> ovlivňuje rychlost a účinnost fotosyntézy také řada dalších vnitřních a vnějších faktorů, které mohou efekt zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> snížit.

Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší na parametry jehlice není jednoznačný. Z experimentů provedených na borovici lesní (*Pinus sylvestris* L.) vyplývá, že koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňuje počet a velikost buněk jehlice a tím pádem její velikost (Lin et al., 2001). Semenáčky, které rostly 4 roky při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>, vykazovaly změny v anatomii jehlice. V běžných podmínkách bylo na abaxiální straně jehlice borovice lesní pozorováno více průduchů, než na adaxiální straně. Po ošetření zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> byla průměrná hustota průduchů na obou stranách odebraných jednoletých jehlic nižší. Záleželo však také na pozici jehlice v koruně, ve vyšších patrech stromu byl efekt snižování hustoty průduchů výraznější. V průměru se plocha řezu jehlic odebraných z různých pater stromu zvýšila o 10,4 % při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. Plocha řezu epidermis a hypodermis se po ošetření nepatrně snížila. Naopak byl pozorován nárůst počtu a velikosti buněk mezofylu a tím i zastoupení vrstvy mezofylu na řezu. Plocha floému na řezu se při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> zvýšila,

plocha xylému se signifikantně nezměnila. Nárůst floému je možné vysvětlit zvýšenou produkcí asimilátů při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> a tím větší potřeby transportu těchto produktů po rostlině (Lin et al., 2001).

Jednoznačný vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na stavbu jehlice borovici lesní nepotvrdili Luomala et al. (2005). Při ošetření zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> nebyly opakovaně pozorovány žádné statisticky významné změny v anatomické stavbě jehlice, naopak teplota měla na stavbu jehlice signifikantní vliv. Při teplotě vyšší, než je dlouhodobý sezónní průměr, měly jehlice nižší hustotu průduchů. Snížený příjem vody, ani nižší míra transpirace, však nebyly pozorovány. Jehlice vystavené zvýšené teplotě měly menší tloušťku, na příčném řezu byl pozorován tenčí mezofyl na abaxiální straně a užší střední válce, než u jehlic kontrolních. Poměrné zastoupení mezofylu a středního válce či mezibuněčných prostor se nezměnilo, z čehož se dá usuzovat, že nedošlo ke změně v rychlosti transportu asimilátů. Tloušťka epidermis a hypodermis nebyla teplotou ovlivněna (Luomala et al., 2005).

Výrazné změny při působení zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> nebyly pozorovatelné na smrku ztepilém. Pokorný et al. (2011) a Lhotáková et al. (2012) prováděli výzkum na stromech pocházejících z experimentální stanice Bílý Kříž v moravskoslezských Beskydech, tedy ze stejného místa, jako vzorky vyhodnocované v této diplomové práci. Výsledky týmu Pokorný et al. (2011) ukázaly mírný nárůst délky jehlice a projekční plochy jehlice (projected needle area) a naopak pokles specifické plochy jehlice (SLA;  $1/LMA$ ) u stromů ošetřených zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>. Statisticky významný byl rozdíl v těchto parametrech pouze v jednom ze tří let, kdy bylo výraznější a déletrvajícím sucho (Pokorný et al., 2011). Dle předchozích výzkumů se stromy rostoucí při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> lépe adaptují na sucho a lépe hospodaří s vodou, proto mělo sucho na stromy bez ošetření CO<sub>2</sub> větší vliv (Kupper et al., 2006). Podobně tomu bylo při výzkumu týmu Lhotáková et al. (2012). V tomto případě míra koncentrace CO<sub>2</sub> ve vzduchu signifikantně neovlivnila objem jehlic, hustotu vnitřního povrchu jehlice, plochu mezofylu, plochu vnitřního válce, ani plochu epidermis a hypodermis, přestože bylo pozorováno zvýšení asimilace CO<sub>2</sub> ( $A_{max}$ ) (Lhotáková et al., 2012). Na měřené parametry měla v obou výzkumech výraznější vliv míra ozáření a stáří jehlice (Pokorný et al., 2011; Lhotáková et al., 2012). Při zvýšené ozáření byl pozorován vyšší objem a větší vnitřní plocha jehlice. Roční jehlice vykazovaly signifikantně nižší vnitřní hustotu mezofylu, než jehlice 3leté. Objem hypodermis a epidermis byl největší u stinných ročních jehlic při obou koncentracích CO<sub>2</sub> (Lhotáková et al., 2012).

To, jak výrazně rostliny reagují na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> v ovzduší, je pravděpodobně podmíněno i dostupností živin (Pritchard et al., 1998; Eguchi et al., 2004). Po ošetření dvouletých semenáčků modřínu japonského (*Larix kaempferi* Carr.) zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>, při nízké koncentraci živin (směs dusíku, fosforu a draslíku) se počet buněk mezofylu a jeho celková plocha snížila, a to i přes to, že buňky mezofylu byly větší. Při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> a dostatku živin byl pozorován naopak nárůst počtu buněk mezofylu. Na tloušťku jehlice na příčném řezu žádné ošetření nemělo vliv, šířka jehlice na příčném řezu se zmenšila při zvýšeném CO<sub>2</sub> a dostatku živin. Rychlost fotosyntézy a obsah škrobu v jehlicích se signifikantně zvýšily při ošetření CO<sub>2</sub> a dostatku živin (Eguchi et al., 2004). K podobným výsledkům došli i Pritchard et al. (1998), kteří zkoumali vliv koncentrace CO<sub>2</sub> a dusíku na anatomii jehlice semenáčků borovice bahenní (*Pinus palustris* Mill.). Při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> a nedostatku dusíku měly jehlice menší plochu mezofylu na řezu. Zároveň se zde projevil změny sezónní. Při měření probíhajícím na jaře měly jehlice ošetřené CO<sub>2</sub> větší plochu způsobenou nárůstem objemu mezofylu. V létě byly jehlice menší a kratší, plocha epidermálních buněk, mezofylových buněk a vodivých pletiv byla redukována (Pritchard et al., 1998).

Na základě prostudované literatury je zřejmé, že se rostlina dokáže přizpůsobit změnám podmínek morfologicky i anatomicky. Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na jednotlivé parametry jehlice je však nejednoznačný. Ukázalo se, že na míru reakce na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> má také veliký vliv dostupnost živin, teplota, či poloha jehlice na stromě (Pritchard et al., 1998; Lin et al., 2001; Eguchi et al., 2004; Luomala et al., 2005).

## 2.2. Ultrastruktura chloroplastů

Chloroplasty jsou orgány endosymbiotického původu, mají tedy svou vlastní DNA, ribozomy a dvě membrány. Jsou oválného tvaru, v průměru měří 0,5-10  $\mu\text{m}$  a jejich ultrastruktura je tak pozorovatelná v transmisním elektronovém mikroskopu (Cabálková et al., 2008). Většinu objemu chloroplastu zabírá endomembránový systém. Ten vznikl z vnitřní membrány chloroplastu a je tvořen tylakoidy. Tylakoidy tvoří síť propojených váčků, jejich vnitřní část se nazývá lumen. Stěsnané, ploché a na sebe naskládané váčky tylakoidů tvoří grana neboli granální tylakoidy. Protážené a nestěsnané tylakoidy se nazývají intergranální neboli stromální tylakoidy (Obr. 2.2). Jednotlivé granální tylakoidy jsou propojeny díky stromálním tylakoidům, které tvoří kolem gran pravotočivou šroubovici. Ta se pomocí výstupků na membráně váčků napojuje na jeden nebo více plochých váčků, které tvoří granum (Daum a Kuehlbrandt, 2011). V chloroplastu jsou dále pozorovatelná kulatá lipoproteinová tělíska – plastoglobuly. Slouží jako zásobárna lipidů a účastní se syntézy tokoferolu a karotenoidů (Brehelin et al., 2007). Jejich velikost a počet se v průběhu vývoje rostliny mění, zvyšuje se však při působení stresů. Lze tedy soudit, že jsou plastoglobuly součástí reakce rostliny na různé druhy abiotických i biotických stresů (Bondada a Syvertsen, 2003; Brehelin et al., 2007; Zhang et al., 2010).

V tylakoidech probíhá primární fáze fotosyntézy, nesou totiž pro fotosyntézu nezbytné pigment-proteinové komplexy (Pavlová, 2005). Granální tylakoidy nesou hlavně světlosběrné komplexy II a fotosystém II (PSII), stromální tylakoidy pak světlosběrné komplexy I, fotosystém I (PSI) a ATP syntázu. Cytochrom  $b_6f$  komplex se nachází na obou typech tylakoidů. Takovéto rozdělení fotosystémů napomáhá efektivnímu zachycování fotosynteticky aktivního záření a předcházení nadměrné excitaci elektronů (Daum a Kuehlbrandt, 2011). Ve fotosystému II dochází k oxidaci vody, při níž se uvolňuje kyslík. K tomuto procesu pomáhá energie fotosynteticky aktivního záření, které je zachyceno pomocí světlosběrných komplexů. Tyto komplexy jsou součástí PSII a obsahují fotosyntetická barviva – chlorofyly a karotenoidy. PSII přenáší 2 elektrony uvolněné při rozkladu vody na plastochinon, protony se uvolňují do lumen tylakoidu a podílejí se na vzniku protonového gradientu, potřebného pro syntézu ATP. Plastochinon dále předává elektrony na cytochrom  $b_6f$  komplex. Přes něj se elektrony pomocí plastocyaninu dostávají na PSI. Tento fotosystém, stejně tak

jako fotosystém II, nese světlosběrné komplexy, které zachycují sluneční záření. Elektrony se dále přesouvají na ferredoxin, kde dochází k redukci NADP na NADPH. Vodíkové kationty jsou využity k výrobě ATP pomocí ATP syntázy, posledního ze 4 typů proteinových komplexů nacházejících se na membráně tylakoidů.

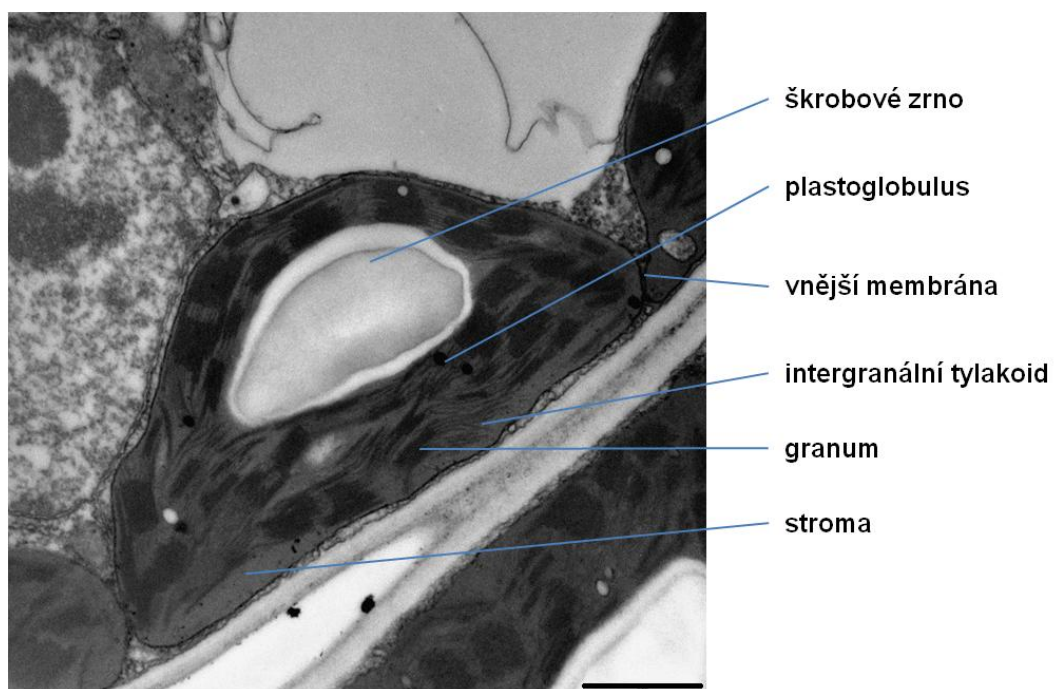
Jako stroma se označuje vnitřní prostor chloroplastu. Je důležité pro sekundární fázi fotosyntézy, probíhá v něm Calvinův cyklus. Při této reakci se vzdušný CO<sub>2</sub> zabudovává do ribulóza-1,5-bisfosfátu za pomoci enzymu ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy-oxygenázy (Rubisco). Následně vzniklý produkt se redukuje na glyceraldehyd-3-fosfát za využití NADPH a ATP z první fáze fotosyntézy. Glyceraldehyd-3-fosfát se rozdělí na fosforylované triózy. Ty mohou být transportovány do cytoplasmy, kde vcházejí do dalších cyklů (Krebsův cyklus, glykolýza, dýchací řetězec), nebo se podílet na vzniku složitějších látek, jako jsou například aminokyseliny a bílkoviny. Část z nich zůstává v chloroplastu a využívá se na regeneraci enzymu Rubisco, nebo je uložena jako zásoba energie ve formě škrobu (Taiz et al., 2015).

Škrob je zásobní polysacharid, který se ukládá v podobě škrobových zrn ve stroma chloroplastů. Počet a velikost škrobových zrn se liší v závislosti na druhu (Stark a Lynn, 1992), dynamicky se mění i během dne (Kivimäenpää et al., 2001; Crumpton-Taylor et al., 2012), a sezóny (Senser et al., 1975; Soikkeli, 1978). Většina škrobu je spotřebována v noci, kdy fotosyntéza neprobíhá. Tento typ škrobu se nazývá asimilační a slouží jako rychlá zásobárna energie. Ve tmě se štěpí na glukózu, jejíž energie je využita na děje probíhající v chloroplastu. Druhý typ škrobu – zásobní, vzniká rozkladem asimilačního škrobu na glukózu a dále na transportní oligosacharidy, které se dostávají z chloroplastu do cytosolu a putují do míst, kde je zvýšená spotřeba energie, či do nezelených částí rostliny. Velká koncentrace tohoto škrobu je ve specializovaných plastidech – amyloplastech, které slouží jako jeho hlavní zásobárna. Kromě této funkce slouží škrob také jako zdroj osmoticky aktivních látek, které rostlina využívá například při uzavírání průduchů, jako osmoprotektanty při vystavení mrazu, či jako statolity, které napomáhají gravitropismu (Pavlová, 2005).

Podle množství asimilačního škrobu v chloroplastech mezofylových buněk můžeme usuzovat, jak intenzivně zde probíhá fotosyntéza a asimilace CO<sub>2</sub>. Množství škrobu je také ovlivněno schopností rostliny efektivně transportovat asimiláty do sinků a využít je pro růst či běžné rostlinné aktivity (Streit et al., 2013). Pokud se v chloroplastu nenachází velké množství škrobu, může to znamenat sníženou

fotosyntetickou aktivitu, či právě velkou spotřebu sacharidů na místě sinků. V případě, že sinky nejsou dostatečně silné a asimilace přesto aktivně probíhá, začnou se asimiláty hromadit v chloroplastech jako škrob (Rasse a Tocquin, 2006).

Obsah asimilačního škrobu v chloroplastech jsem si zvolila jako parametr pro vyhodnocení vlivu ozářenosti a CO<sub>2</sub> na jehlici smrku ztepilého. Dále se tedy budu zabývat vlivem těchto vnějších faktorů na stavbu jehlice, ultrastrukturu chloroplastů a množství asimilačního škrobu v chloroplastech.



Obr. 2.2 Snímek chloroplastu z buňky mezofylu jehlice smrku ztepilého, získaný z transmisního elektronového mikroskopu. Úsečka v pravém dolním rohu znázorňuje délku 1  $\mu\text{m}$ . Autor snímku: Barbora Radochová

### 2.2.1. Vliv vybraných faktorů na počet, velikost a ultrastrukturu chloroplastů

Na ploše listu o velikosti  $1\text{cm}^2$  se průměrně nachází až 10 milionu chloroplastů (Evans, 1999). Ty jsou uloženy v listovém pletivu mezofyl. Stavba mezofylu a počet chloroplastů pak přímo souvisí s procesem fotosyntézy, výzkumy na borovici lesní například ukázaly pozitivní korelaci velikosti plochy mezofylu na řezu a rychlosti fotosyntézy (Lin et al., 2001). Na počet, velikost a ultrastrukturu chloroplastů v mezofylu listu má vliv více vnějších i vnitřních faktorů. Patří mezi ně také ozáření. Při výzkumu efektu zastínění na stavbu jehlic jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.) bylo zjištěno, že více zastíněné jehlice mají menší počet chloroplastů. Ty mají zároveň menší plochu na řezu, nižší obsah asimilačního škrobu a méně plastoglobulů. Systém tylakoidů má větší plochu na řezu, počet gran je však menší, než v chloroplastech jehlic, na které dopadá více slunečního záření. Počet tylakoidů v granu je u zastíněných jehlic vyšší (Kierzkowski et al., 2007). Jak je zřejmé z dalších výzkumů, záleží také na pozici chloroplastu v jehlici. Mezofylové buňky ležící blíže epidermis obsahovaly menší chloroplasty s nižším obsahem asimilačního škrobu, než buňky ve vnitřní části jehlice blíže endodermis. Naopak počet plastoglobulů byl vyšší v buňkách blíže epidermis (Kivimäenpää a Sutinen, 2007).

Dalším z vnějších faktorů ovlivňujících chloroplasty je koncentrace  $\text{CO}_2$  v ovzduší. Větší plochu, avšak nezměněnou délku chloroplastů při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  v ovzduší, potvrdily výzkumy na borovici bahenní (Pritchard et al., 1997). Také ultrastruktura chloroplastů se vlivem koncentrace  $\text{CO}_2$  mění, jak se ukázalo při pozorování chloroplastů více druhů listnatých dřevin (javor červený (*Acer rubrum* L.), zmarlinka kanadská (*Cercis canadensis* L.), ambroň západní (*Liquidambar styraciflua* L.) a pepřovník ušatý (*Piper auritum* Kunth.)). Chloroplasty listů ošetřených zvýšenou koncentrací  $\text{CO}_2$  měly větší poměr stromálních tylakoidů ku granálním. Stejně tak měly větší poměr stromálních tylakoidů k celkové ploše chloroplastu, zatímco poměr granálních tylakoidů ku celkové ploše chloroplastu byl naopak menší (Griffin et al., 2001). Dle dostupné literatury reagují na zvýšenou koncentraci  $\text{CO}_2$  podobně i byliny. Výzkumy na tabáku lesním (*Nicotiana sylvestris* Speg. et Comes) ukázaly, že chloroplasty vystavené zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  měly stejnou délku na řezu, jako ty bez ošetření, jejich šířka na řezu se však zvýšila. Chloroplasty totiž obsahovaly velké



množství škrobových zrn, která zabírala více jak 50 % jejich plochy. Po ošetření se také velmi výrazně navýšil počet chloroplastů na jednotku plochy buňky mezofylu (Wang et al., 2004). Při porovnání výzkumů z velkého vzorku rostlin se ukázalo, že stromy reagují na zvýšené CO<sub>2</sub> výraznějšími morfologickými, anatomickými i biochemickými změnami, než byliny (Ainsworth a Long, 2005).

Počet, velikost a ultrastruktura chloroplastů nejsou v průběhu vegetační sezony stabilní. Roční dynamika počtu, velikosti a ultrastruktury chloroplastů buněk mezofylu byla popsána u více druhů jehličnanů, např. tisu japonského (*Taxus cuspidate* S. et Z. ex E.), zelené a žluté formy zeravu západního (*Thuja occidentalis* L. a *Thuja occidentalis* f. „Reingold“) a smrku ztepilého. Výsledky u většiny těchto jehličnanů vykazují podobné trendy (Senser et al., 1975; Soikkeli, 1978; Maslova et al., 2009). Nejvyšší počet chloroplastů v buňce a největší chloroplasty byly pozorovány v zimě. Systém tylakoidů byl však v zimě chudší, převažovala grana o 2-3 tylakoidech a stromální tylakoidy (Maslova et al., 2009). Demming-Adams et al. (2015) pozorovali rozdíl ve změně stavby tylakoidů v chloroplastech na subalpínských jehličnanech smrku Engelmannovém (*Picea engelmannii* Parry ex Engelm.) a jedli plstnatoplodé (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.). Velká část systému tylakoidů obou druhů jehličnanů se s příchodem zimy změnila z granálních na stromální. Zároveň bylo v zimě naměřeno výrazně nižší maximální využití PSII ( $F_v/F_m$ ) a také nižší rychlost fotosyntézy, než na podzim. Takovéto změny vedou k rozptylu tepelné energie (thermal energy dissipation) a působí jako ochrana před fotopoškozením při nízkých teplotách (Demmig-Adams et al., 2015). Na začátku jara klesla četnost i velikost chloroplastů, zvýšil se však počet plastoglobulů (Senser et al., 1975; Maslova et al., 2009). V létě s nárůstem teploty a délky světelného dne narostla i velikost chloroplastů. Nacházelo se v nich velké množství škrobových zrn, systém tylakoidů byl také dobře vyvinut a obsahoval grana až o 7-8 tylakoidech (Senser et al., 1975; Soikkeli, 1978). Nejmenší počet, a zároveň i plocha chloroplastů, byl na konci léta a během podzimu, systém tylakoidů byl přesto dobře vyvinut (Maslova et al., 2009).

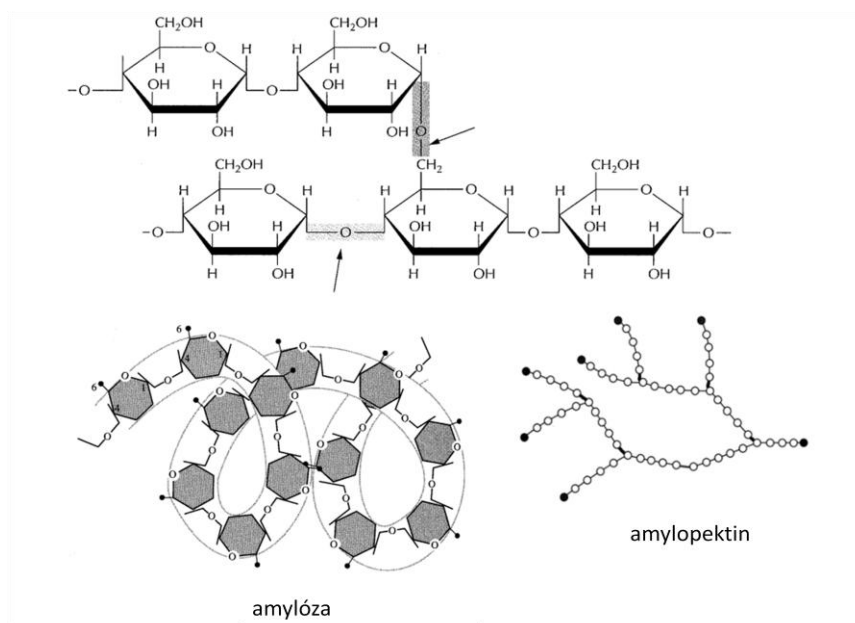
Stárnutí jehlic je proces, který se také projeví na stavbě chloroplastu v buňkách mezofylu. Kivimäenpää a Sutinen (2007) uvádějí, že nejstarší a již žluté jehlice borovice lesní měly v buňkách mezofylu až o polovinu menší chloroplasty, než jehlice mladší. Tyto chloroplasty obsahovaly více plastoglobulů, než chloroplasty zelených jehlic. V případě tohoto druhu se žloutnutí objevuje u 4 roky starých jehlic, které již

nejsou fotosynteticky aktivní a většinou záhy (během 14 dnů) opadají (Kivimäenpää a Sutinen, 2007). V případě smrku ztepilého jsou fotosynteticky aktivní roční až tříleté jehlice, k jejich opadání za běžných podmínek u dospělých stromů dochází průměrně po 8 letech (Campbell et al., 2004). Většina studií na jehličnanech se zabývá ročními jehlicemi, stejně tak je tomu i v případě této diplomové práce. Výzkumy na starších jehlicích jsou ojedinělé, díky nim lze však pozorovat, kdy jehlice přestávají být zdrojem asimilátů a stávají se naopak sinkem.

## 2.3. Asimilační škrob a jeho funkce

Asimilační škrob je polysacharid nacházející se v chloroplastech. Je tvořený dvěma složkami – amylosem a amylopektem. Škrobová zrna se v plastidech tvoří kolem jednoho iniciačního bodu. Vytváří se z ADP-glukózy, která vznikla reakcí glukózy-1-fosfátu s ATP, katalyzovanou enzymem ADP-glukózapyrofosforyláza po druhé fázi fotosyntézy. Další potřebný enzym – škrobsyntáza, katalyzuje připojení ADP-glukózy na již existující polysacharidový řetězec, přičemž vzniká polymer alfa-D-glukózy. Při spojení molekul alfa-D-glukózy vazbou alfa1-4 vzniká amylose, amylopektin má kromě vazby alfa1-4 ještě vazbu alfa1-6, kterou spojuje glukózové zbytky (Obr. 2.3) (Pavlová, 2005).

Asimilační škrob zůstává v chloroplastu jen krátkou dobu v řádu hodin. Ve tmě se spotřebovává přímo v chloroplastu, nebo se po rozkladu na glukózu a dále na transportní oligosacharidy dostává do cytosolu a přesune se na místo sinku. Takto transportované asimiláty se dále mohou usazovat v amyloplastech a tvořit tak energetické zásoby. Další z funkcí asimilačního škrobu je udržování osmotické rovnováhy v chloroplastu, jelikož škrob je osmoticky neaktivní, na rozdíl od monosacharidů či oligosacharidů (Pavlová, 2005).



Obr.2.3 Amylose a amylopektin – struktura. Převzato z publikace (Pavlová, 2005); upraveno podle Anderson J.W., Beardall J.: Molecular activities of plant cells. - Blackwell Sci. Publ., Oxford 1991.

### 2.3.1. Vliv ozáření na fotosyntézu a obsah asimilačního škrobu v chloroplastech

Ozáření je jedním ze základních faktorů ovlivňujících fotosyntézu a tedy i obsah asimilačního škrobu v chloroplastu. Množství sluneční energie dopadající na listy má vliv na množství energie, která se uloží do chemických vazeb. Tato míra nicméně závisí i na dalších faktorech, které ji přímo či nepřímo ovlivňují (Cabálková et al., 2007). Sluneční záření nedopadá na všechny části rostliny rovnoměrně, rostliny proto mají vyvinuty morfologické, fyziologické a biochemické adaptace na prostředí, ve kterém rostou. Díky těmto přizpůsobením dokážou maximalizovat množství zachyceného světla při nízké ozáření a naopak předejít případnému poškození při nadměrném ozáření (Walters, 2005).

Nadměrná ozáření je stav, který může lehce nastat v poledne nebo na přímém slunci, a který může rostlinu poškodit (Barber a Andersson, 1992). Z tohoto důvodu rostliny nejvíce asimilují ráno, v době poledne jejich fotosyntetická aktivita výrazně klesá. Tento trend byl nazván polední deprese asimilace a nastává z důvodu zavírání průduchů a následného snížení koncentrace CO<sub>2</sub> v mezibuněčných prostorách (Guo et al., 2009). V odpoledních hodinách se rychlost fotosyntézy zase zvýší, nicméně již nedosahuje tak vysokých hodnot, jako ráno. Důvodem je nejspíš nedostatek anorganického fosfátu v chloroplastech, který je potřeba pro výrobu ATP a regeneraci enzymu Rubisco (Špunda et al., 2005; Huang et al., 2006).

Existují různé způsoby, jak se rostlina může nadměrné ozáření bránit. Mezi krátkodobé odpovědi patří např. migrace světlosběrných antén mezi fotosystémy (tzv. state transition). V případě nadměrné excitace PSII se část světlosběrných komplexů fotosystému II přesune na PSI. Jakmile nastane nadměrná excitace na PSI, světlosběrné komplexy fotosystému II se vrátí zpět k PSII (Mullineaux a Emllyn-Jones, 2005). Další možností ochrany fotosyntetického aparátu před nadměrnou ozáření je xantofylový cyklus. Nízké pH v lumen tylakoidů způsobuje aktivaci enzymu violaxantin-deepoxidázy, která změní violaxantin na zeaxantin. Takto pozměněný karotenoid dokáže přeměnit energii z nadměrného ozáření na teplo, čímž ochrání fotosystémy před trvalým poškozením. Takováto reakce byla potvrzena při výzkumu semenáčků smrku ztepilého, které byly po dobu 10 dní vystaveny intenzivnímu slunečnímu záření. V tomto případě však nebylo pozorováno zvýšení poměru chlorofylů a/b, což je jev

často pozorovaný v chloroplastech aklimatizovaných na vysokou ozáření (Kurasová et al., 2003; Štroch et al., 2008). Mezi fotoinhibiční procesy se dále řadí deaktivace proteinů D1 a D2. Tyto proteiny jsou součástí PSII a jsou velmi citlivé ke zvýšené ozáření. D2 je stabilnější než D1 a pro jeho vyřazení je potřeba více slunečního záření, mechanismy jejich degradace na sebe ale navazují. K degradaci proteázami ve stromatu dochází v důsledku vytvoření agregátů s okolními peptidy (Shipton a Barber, 1994; Ballottari et al., 2007). Agregaci pravděpodobně vyvolávají reaktivní formy kyslíku, které jsou produkovány v tylakoidech při zvýšené ozáření i teplotě (Ohira et al., 2005).

Za slunečných podmínek může být pro rychlost fotosyntézy limitující nedostatek vody. Aby bylo zabráněno vysokému odparu, snižuje se vodivost průduchů, což má za následek snížení koncentrace  $\text{CO}_2$  v mezibuněčných prostorech a snížení jeho asimilace (Panek a Goldstein, 2001). Nadměrná ozáření také často nastává v kombinaci s vysokou teplotou. Citlivost na vysokou teplotu a schopnost adaptace se liší druh od druhu. Byla pozorována i vnitrodruhová variabilita s ohledem na různé místo výskytu pozorovaného jedince (Weston a Bauerle, 2007).

Na výzkum kombinace efektu vysoké ozáření a teploty u smrku ztepilého se zaměřili Štroch et al. (2010). Pozorované semenáčky vykazovaly výrazně nižší asimilaci  $\text{CO}_2$  z toho důvodu, že se zvýšila afinita enzymu Rubisco k  $\text{O}_2$  a docházelo častěji k fotorespiraci. Ukázalo se také, že v tomto případě k ochraně rostlina nevyužívala tolik xantofylový cyklus, ale typ přenosu elektronů, který nevede k asimilaci (non-assimilatory electron transport pathway). Tento způsob byl pro ni natolik efektivní, že nedošlo k permanentní fotoinhibici a PSII si dokázal udržet maximální možnou účinnost i v těchto stresových podmínkách (Štroch et al., 2010).

Rostlina reaguje rozdílně v případech, kdy na ni působí přímé sluneční záření a kdy rozptýlené světlo. Urban et al. (2007) se zaměřili na porovnání fotosyntetické aktivity v jehlicích smrku ztepilého při přímé ozáření a při oblačnosti. Prokázali, že při rozptýleném světle je rychlost asimilace  $\text{CO}_2$  vyšší, než při přímém ozáření. Tento fakt je připisován otevřenosti průduchů a vyšší stimulaci fotosyntézy díky vyššímu poměru modrého a červeného záření při rozptýleném světle. Záření je také rovnoměrně rozprostřeno mezi listy, zatímco při přímém záření vytváří více stínu a zabraňuje tak pronikání světla do nižších pater podrostu či koruny (Urban et al., 2007).

Většinu času nejsou všechny fotosyntetizující orgány rostliny ozářeny stejně. Růst rostliny v podrostu či vzájemné zastínění listů v koruně stromu jsou příkladem toho, kdy může být fotosyntéza limitována dopadajícím zářením. Li et al. (2009) se zaměřili na porovnání koncentrace škrobu v různě starých jehlicích (0-5 let) a listech alpských nahosemenných druhů *Abies georgie* a *Juniperus saltuaria*. Jehlice a listy odebírali z různých pater koruny a předpokládali, že budou vykazovat gradient koncentrace škrobu s ohledem na rozdílné ozáření. Žádné signifikantní rozdíly ale nenašli. Dá se předpokládat, že vytvořené nestrukturní sacharidy, včetně asimilačního škrobu po rozložení na transportní oligosacharidy, jsou z vyšších pater koruny částečně přemístěny do nižších pater a vyrovnávají tak rozdíly způsobené nižší efektivitou fotosyntézy v nižších, méně ozářených patrech koruny (Li et al., 2009). Efektivní využití slunečního záření závisí také na tom, je-li rostlina v přirozeném prostředí spíše stínomilná či světlomilná. Niinemets (1997) porovnával gradienty obsahu škrobu v listech v korunách 4 evropských listnatých stromů. U všech druhů byl pozorován nárůst škrobu v chloroplastech se zvyšující se ozářeností. Nejzřetelnější však byl u světlomilných stromů dubu letního a topolu osiky, jelikož tyto druhy dokážou efektivněji využít své vnitřní fotosyntetické kapacity. U stínomilných druhů střemchy obecné (*Padus avium* Mill.) a javoru mléč byl obsah škrobu nižší, signifikantně se však nelišil od zbylých dvou druhů (Niinemets, 1997).

Hypotézu, že je koncentrace škrobu určována fotosyntetickou produkcí, se nepodařilo potvrdit výzkumnému týmu Niinemets a Kull (1998). Při měření koncentrace škrobu v listech 5 druhů stromů v závislosti na ozáření naměřili různé výsledky. Topol osika a líska obecná vykazovaly zvýšení, naopak jasan ztepilý a lípa srdčitá snížení koncentrace škrobu v listech při vyšší ozářenosti. U buku lesního se závislost mezi koncentrací škrobu a intenzitou záření neprojevila. Dle autorů koncentrace škrobu souvisí spíše s osmotickou regulací vodního potenciálu. Škrob se pravděpodobně degraduje při nedostatku vody, což je faktor, který často doprovází zvýšené sluneční záření (Niinemets a Kull, 1998).

Na základě nastudované literatury je možné soudit, že zvýšená ozářenost stimuluje rychlost fotosyntézy a v chloroplastech ozářených listů můžeme předpokládat více škrobu, než v chloroplastech zastíněných listů. Tento jev je však podmíněn dalšími vnějšími faktory, jako je například teplota a dostupnost vody. Ukázalo se také, že reakce

rostliny je druhově specifická, u některých druhů se závislost mezi obsahem škrobu v chloroplastech a mírou ozáření nepotvrdila.

### 2.3.2. Vliv CO<sub>2</sub> na obsah asimilačního škrobu v chloroplastech

Důležitým faktorem, který ovlivňuje množství asimilačního škrobu v chloroplastu, je koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší. Dosavadní výzkumy potvrzují, že se zvyšováním koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší se zvyšuje množství škrobu vytvořeného při fotosyntéze (Pritchard et al., 1997; Liu et al., 2005). Pro tento trend se udávají různá vysvětlení. Enzym Rubisco, který má relativně nízkou afinitu k CO<sub>2</sub>, není současnou koncentrací CO<sub>2</sub> saturován a nevyužívá se tak jeho plného potenciálu. Při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub> tedy pracuje efektivněji a dochází ke zvýšené karboxylaci a zvýšené produkci sacharidů, tedy i asimilačního škrobu (Drake et al., 1997). Dalším vysvětlením je snížená míra fotorespirace. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> inhibuje oxygenaci Ribulóza-1,5-bisfosfátu, čímž dochází ke zvýšené asimilaci CO<sub>2</sub> na úkor O<sub>2</sub> a tedy zvýšené produkci asimilátů (McGrath a Lobell, 2013). Míra, kterou se udává efektivita fotosyntézy při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> je tzv. specificita enzymu Rubisco. Jde o poměr karboxylační a oxygenační aktivity při rovnocenné dostupnosti O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>. Tato hodnota tedy může být využita při předpovídání přímé odpovědi rostlin na zvyšování CO<sub>2</sub> v atmosféře (Drake et al., 1997).

Zvýšená účinnost fotosyntézy při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> není stálý stav. Po určité době dochází k aklimaci na vyšší obsah CO<sub>2</sub> v ovzduší a efektivita se opět částečně sníží, stejně tak jako obsah enzymu Rubisco. Dochází k tomu pravděpodobně proto, že rostliny již nejsou schopny využívat či ukládat nadbytečné cukry. Síla sinků v tomto případě tedy není dostatečná, asimiláty nejsou využívány a fotosyntéza je zpětně potlačena. Tento stav je ovšem vratný a v případě obnovení potřeby asimilátů se účinnost fotosyntézy opět zvyšuje (Drake et al., 1997).

Vzhledem k tomu, že je zvyšování koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší aktuální téma, zabývá se jím velké množství výzkumných týmů (shrnuto v Ainsworth a Long, 2005). Výzkumy prokázaly větší množství škrobu po ošetření CO<sub>2</sub> v různých zemědělsky či komerčně využívaných rostlinách, např. lilek brambor (*Solanum tuberosum* cv. Kennebec) (Barnaby et al., 2015), gerbera Jamesonova (*Gerbera jamesonii*) (Xu et al., 2014) a smrk ztepilý (Cabálková et al., 2007). Vzhledem k zaměření diplomové

práce se tato kapitola bude zabývat problematikou vlivu CO<sub>2</sub> na dřeviny s C3 typem metabolismu.

Cabálková et al. (2008) potvrzují pozitivní vliv CO<sub>2</sub> na velikost a četnost škrobových zrn u smrku ztepilého. Při vystavení ročních jehlic zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> byl pozorován nárůst obsahu škrobu v chloroplastech. Změny byly nejvíce znatelné v jehlicích odebíraných na podzim, kdy naasimilovaný škrob pravděpodobně tvoří energetické zásoby na zimu (Cabálková et al., 2008). Může však také jít o zpožděné mrazové otužování. Při mrazovém otužování (frost hardening) se škrob při nízkých teplotách rozloží na monosacharidy, které pak rostlina využívá jako osmoprotektanty (Kitao et al., 2004). Stejně tak se ukázal pozitivní vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na obsah škrobu v jehlicích smrku ztepilého, a to jak v případě jeho růstu v monokultuře, tak i při interakci s bukem lesním (Liu et al., 2004; Liu et al., 2005).

U některých zkoumaných druhů bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> na jaře pozitivně ovlivňuje rašení pupenů. Jehlice semenáčků východoasijského smrku *Picea glehnii*, ošetřených po dobu 40 dnů zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>, vyrašily o 4 dny dříve, než jehlice semenáčků bez ošetření (Kitao et al., 2012). V pupenech ošetřených stromů se také nacházelo 2x více škrobu. U 1 rok starých jehlic nebyl pozorován žádný rozdíl v obsahu škrobu v závislosti na ošetření CO<sub>2</sub>. V jehlicích se těsně po vyrašení výrazně zvýšilo množství škrobu, následně se ale vrátilo na původní hodnotu a nadále zůstalo konstantní. Stejný trend však byl pozorován u jehlic bez ošetření a pravděpodobně odpovídá zvýšené energetické spotřebě jehlice v prvních dnech po vyrašení. Je však možné, že ošetření nezanechalo na ročních jehlicích znatelné následky vzhledem k relativně krátké době působení zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na rostlinu (Kitao et al., 2012). Závislost doby vyrašení pupenů na teplotě a koncentraci CO<sub>2</sub> byla zkoumána i u smrku ztepilého. V tomto případě ale nebylo pozorováno dřívější rašení pupenů či nárůst délky výhonků po ošetření zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (Roberntz, 1999; Slaney et al., 2007).

Ačkoliv se pozitivní korelace mezi koncentrací CO<sub>2</sub> v ovzduší a produkcí škrobu potvrzuje ve více výzkumech, je zřejmé, že zde působí i další vnější podmínky (Pritchard et al., 1997). Míra úživnosti půdy mění reakci rostliny na množství CO<sub>2</sub> ve vzduchu. Ze studií týmu Pritchard et al. (1997), který zkoumal vliv různých stresových faktorů na růst borovice bahenní vyplývá, že rostliny vystavené zvýšené koncentraci



CO<sub>2</sub> a zároveň stresované nedostatkem dusíku a vody v půdě produkují výrazně více škrobu. V takovém případě se v chloroplastech hromadí uhlíkaté metabolity, protože z důvodu nedostatku dusíku je pro ně málo sinků, kde by se spotřebovaly, a nedostatek vody takový stav ještě umocňuje. Tento trend byl však pozorován pouze na podzim, na jaře se závislost nepotvrdila (Pritchard et al., 1997).

### 2.3.3. Roční dynamika obsahu asimilačního škrobu

Chloroplasty jsou orgány citlivé na změny teplot. Jejich ultrastruktura reaguje na vnější podmínky a mění se tak s ročním obdobím. Senser et al. (1975) zkoumali stavbu jehlice a množství škrobu v chloroplastech u 50letého smrku ztepilého, sezónní dynamiku zaznamenávali po dobu 3 let. Roční dynamikou taktéž u smrku ztepilého se později zabývali Cabálková et al. (2008), výzkum s podobným zaměřením provedli i Kitao et al. (2004) na východoasijském smrku *Picea glehnii*. Výsledky těchto experimentů vykazovaly podobné trendy (Senser et al., 1975; Kitao et al., 2004; Cabálková et al., 2008).

Nejvyšší obsah škrobu v jehlicích je na začátku jara (Senser et al., 1975; Kitao et al., 2004; Cabálková et al., 2008). Škrobová zrna jsou velká a dosahují délky 0,5-8 μm (Senser et al., 1975; Cabálková et al., 2008). Fotosyntéza je v této roční době již aktivní, škrob se ale ještě přímo nezačal spotřebovávat na růstové procesy. Zároveň dochází ke snížení maximálního využití PSII ( $F_v/F_m$ ) i efektivního výtěžku elektrotransportního řetězce ( $\Phi_{PSII}$ ), což se vysvětluje jako zotavení fotosyntetického aparátu po zimě. Po vyrašení pupenů se  $\Phi_{PSII}$  znovu navýší, čímž se obnoví efektivita PSII (Kitao et al., 2004). Roční a dvouleté jehlice fungují jako zdroj energie pro pupeny vznikající v následujících sezonách a obsah škrobu v nich se navyšuje od února, kdy končí období přizpůsobení na zimu (frost dehardening). Naopak koncentrace dalších cukrů, které se mohou přeměnit na glukózu a dále pak sloužit pro syntézu zásobního škrobu (sacharóza, fruktóza), se snižuje až do chvíle, než vyraší nové jehlice (Egger et al., 1996). Chloroplasty v této době fungují spíše jako amyloplasty. Nemají klasický membránový systém a obsahují velká škrobová zrna, která se během noci nespotebovávají. Jakmile jehlice dorostou do délky přibližně 1 cm, obsah škrobu se výrazně sníží a v chloroplastech se znovu vytvoří systém tylakoidů (Senser et al., 1975).

V červenci jsou jehlice již plně vyvinuty a dosahují délky kolem 3cm (Senser et al., 1975). Všechna velká zrna jsou spotřebována na růst nových jehlic, proto byla největší naměřená zrna dlouhá maximálně 6  $\mu\text{m}$  (Cabálková et al., 2008). Jehlice si po asi 50 dnech od vyrašení začínají samy produkovat dostatečné množství asimilátů a ukládat škrob, přestávají tak být sinkem a stávají se zdrojem asimilátů (Egger et al., 1996). Přes den se v chloroplastech těchto jehlic nachází relativně velké množství škrobu, který se ale začíná krátce po setmění degradovat. Po pár hodinách je škrob zcela spotřebován a chloroplasty jsou opět vyplněny membránovým systémem. V létě je navíc dobře pozorovatelná heterogenita ultrastruktury jehlice, která je způsobena různou dostupností a intenzitou světla. V buňkách blíže pokožkové vrstvy obsahují chloroplasty větší množství škrobu, než v buňkách kolem cévních svazků (Senser et al., 1975). Takovéto trendy byly pozorovány i při výzkumu na smrku ztepilém rostoucím na experimentální stanici Bílý Kříž (Barbora Radochová, 2015; osobní konzultace). V mezofylových buňkách je možné nalézt i chloroplasty, které již neobsahují žádné vnitřní membrány. Ty byly pravděpodobně zničeny při dlouhodobém uložení velkého množství škrobu (Senser et al., 1975).

Začátek podzimu je období, kdy obsah škrobu nabývá druhého maxima (Senser et al., 1975). Škrobová zrna dosahují délky až 10  $\mu\text{m}$  (Cabálková et al., 2008). Později asimilace ustává a v chloroplastech se nachází výrazně méně škrobu. Dochází tak k otužování rostliny nízkými teplotami a mrazem (Bertrand a Bigras, 2006). V zimě je škrobu minimum, v chloroplastech se nachází více stromálních, než granálních tylakoidů (Demmig-Adams et al., 2015) a malé množství plastoglobulů (Senser et al., 1975). Brzy na jaře se asimilace škrobu obnovuje a to jak v buňkách celého mezofylu, tak v buňkách pochev cévních svazků (Senser et al., 1975).

Jednou z typických změn, kterými stálezelené rostliny v temperátních a boreálních ekosystémech prochází na podzim, je již zmiňované mrazové otužování (frost hardening). Jde o komplexní proces, který způsobuje snížení fotosyntetické aktivity a umožňuje stálezeleným jehličnanům zvýšit odolnost vůči mrazu (Kitao et al., 2004). Při nízkých teplotách se rychlost fotosyntézy snižuje z důvodu nedostatku potřebných enzymů, jako například Rubisco. Aklimace tedy spočívá v jeho navýšení nad limitující hladinu (Holaday et al., 1992). Teplota, při které se tento proces aktivuje, je druhově specifická a odvíjí se od průměrné denní teploty, které je rostlina vystavena (Greer et al., 2000).

Při výzkumu týmu Greer et al. (2000) bylo zjištěno, že je možné teplotní hranici mrazového otužování ovlivnit. Semenáčky borovice paprsčité (*Pinus radiata* D. Don), byly vystaveny teplotám od 25 do 10°C po dobu 100 dní. Po takovémto ošetření se rostliny staly odolnými vůči výrazně nižším teplotám. Zvýšila se také akumulace biomasy, která pozitivně korelovala s teplotou. V semenáčcích se nepatrně zvýšila koncentrace glukózy, fruktózy, sacharózy a dalších nestrukturních sacharidů, zatímco koncentrace škrobu se výrazně snížila. Tato skutečnost je nejspíše příznakem snížené fotosyntetické aktivity semenáčků a jejich růstu při nedostatku zdrojů (Greer et al., 2000).

Odlíšné reakční odpovědi na nízkou teplotu se ukázaly při pozorování dalších druhů stromů (smrk ztepilý, bříza pýřitá (*Betula pubescent* Ehrh.), vrba sp. (*Salix* sp.). Ty byly porovnávány se třemi druhy bylin (kostřava ovčí (*Festuca ovina* L.), chrstice rákosovitá (*Phalaris arundinacea* L.), ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.)), přičemž se ukázalo několik rozdílů, ze kterých je možné usuzovat na odlišné mechanismy otužování stromů a bylin (Hjelm a Ogren, 2003). Při pozorování stromů bylo zjištěno, že se i při zvýšení rychlosti fotosyntézy v jejich listech koncentrace nestrukturních sacharidů nemění. Je to z toho důvodu, že se přebytečné cukry ukládají jako škrobová zrna. Rostlina tak může fungovat bez ohledu na teplotu a rytmus růstu a udržet si vysokou rychlost fotosyntézy. Takováto efektivita nebyla pozorována u trav, které si ve formě škrobu ukládaly výrazně méně nestrukturních sacharidů. Děje se tak pravděpodobně proto, že byliny potřebují vyšší koncentraci volných cukrů k tomu, aby došlo k jejich ukládání ve formě zásobního škrobu (Hjelm a Ogren, 2003).

## 2.4. Vliv dalších faktorů na stavbu jehlice a ultrastrukturu chloroplastů

Morfologii, anatomii a fyziologii listu ovlivňuje velké množství biotických i abiotických faktorů. Patří mezi ně například dostupnost vody, znečištění ovzduší či koncentrace ozonu v ovzduší. Jehličnany pak patří ke skupině stromů, které jsou k abiotickým stresům citlivé nejvíce (Albrechtová et al., 2007; Lukjanova et al., 2013). Zde budou stručně popsány efekty dalších vnějších abiotických faktorů na stavbu jehlice a chloroplastů s přihlédnutím k asimilačnímu škrobu.

### 2.4.1. Dostupnost vody

Nedostatek vody je problém, který může sužovat jehličnany v teplejších oblastech či při teplotních výkyvech během sezóny. Sucho způsobuje zvýšené uzavírání průduchů, sníženou efektivitu PSII a sníženou asimilaci CO<sub>2</sub> (Muilu-Makela et al., 2015). Stromy se suchým podmínkám nejčastěji přizpůsobují zvětšením kořenové plochy, změny jsou však viditelné i ve stavbě jehlic. Vrstva hypodermis a vodivá pletiva jsou struktury jehlice, které hrají v rezistenci proti suchu klíčovou roli (Lopez et al., 2008). V roce 2003 a 2008 proběhly výzkumy borovice kanárské (*Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC) a její schopnosti adaptace na sucho. Jehlice stromů stresovaných suchem byly kratší, než jehlice borovic rostoucích při dostatečném zavlažení. Jejich tloušťka byla menší (Grill et al., 2004), šířka zůstávala stejná (Lopez et al., 2008). Počet průduchů ani počet jejich řad nebyl ovlivněn, při zmenšení povrchu jehlice se tedy zvýšila jejich hustota. Průduchy těchto borovic byly také zanořeny hluboko pod vrstvou pokožky, což je jeden z typických znaků xerofytních rostlin (Grill et al., 2004). Lopez et al. (2008) pozorovali nárůst poměrného zastoupení plochy vrstev epidermis a hypodermis na řezu a také vyšší poměrné zastoupení vrstvy endodermis u jehlic rostoucích v dostatečně vlhkém prostředí. Relativní plocha všech tří vrstev se snižovala se vzrůstajícím suchem (Grill et al., 2004; Lopez et al., 2008). V případě výsledků týmu Grill et al. (2004) se při stresu suchem plocha hypodermis na příčném řezu naopak zvýšila z důvodu zvýšeného počtu jejich buněk. Nárůst této tuhé sklerenchymatické vrstvy pomáhá udržet stavbu jehlice a omezit nadměrnou transpiraci. Pletivo mezofyl

bylo zastoupeno ve 2-3 vrstvách a jeho plocha negativně korelovala se vzrůstajícím suchem. Menší byla i plocha středního válce s vodivými pletivy (Grill et al., 2004). Poměr plochy cévních svazků ku ploše mezofylu se však při snižování dostupnosti vody zvýšil. Procentuální zastoupení vodivých pletiv v jehlicích se zvýšilo až dvojnásobně, oproti jedincům rostoucím ve vlhkém nebo středně vlhkém prostředí. Ukazuje se tedy, že rostliny v období sucha investují velké množství asimilátů do mechanických struktur (Grill et al., 2004; Lopez et al., 2008).

Nedostatek vody má vliv také na velikost a ultrastrukturu chloroplastů (Kivimäenpää et al., 2003; Zellnig et al., 2010). Studie na smrku ztepilém ukázaly, že při nedostatku vody byly v jehlicích chloroplasty menší. Kivimäenpää et al. (2003) popsali také viditelné změny tvaru, chloroplasty stromů stresovaných suchem byly kulatější (Kivimäenpää et al., 2003). Zellnig et al. (2010) však podobné změny nepozorovali a dle jejich výsledků byly chloroplasty oválného tvaru beze změny (Zellnig et al., 2010). V chloroplastech se při nedostatku vody také nenacházela žádná škrobová zrna (Zellnig et al., 2010), nebo byl jejich počet výrazně redukován oproti kontrolním rostlinám (Kivimäenpää et al., 2003). V těchto chloroplastech byl také pozorován nárůst procentuálního zastoupení plastoglobulů a tylakoidního systému (Zellnig et al., 2010).

#### **2.4.2. Okyselení půdy**

Sopečná činnost, spalování fosilních paliv či například aplikace zemědělských hnojiv jsou jevy, při kterých se zvyšuje koncentrace sirných a dusíkatých oxidů v atmosféře. Ty se pak při srážkách dostávají zpět do koloběhu v podobě kyselých dešťů. Následné okyselení půdy a vodních zdrojů zanechává stopy i na rostlinách (Albrechtová et al., 2007). V druhé polovině 20. století představovalo ve střední Evropě velké množství oxidu siřičitého a fluoru v atmosféře jedno z největších zatížení dřevin, včetně smrku ztepilého. Výzkumy prokázaly, že zvýšená kyselost půdy způsobuje defoliaci a náchylnost stromů k dalším abiotickým stresům (Lomský et al., 2012).

Vliv kyselých dešťů na anatomii jehlice byl pozorován také u smrku ztepilého. Výzkum týmu Albrechtová et al. (2007) probíhal na stromech rostoucích v Botanické zahradě Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Již po 1 roce ošetření byly

na jehlici viditelné výrazné změny, a to hlavně na úrovni mezofylu. V jehlicích vystavených simulaci kyselých dešťů se zvýšil objem mezibuněčných prostor na plochu mezofylu na řezu. Poměrné zastoupení mezofylu se však nezměnilo, počet buněk mezofylu na jednotku objemu jehlice se tedy snížil. Nižší byla i celková vnitřní plocha jehlice na řezu, celkový počet buněk mezofylu na řezu i plocha řezu. Tyto vnitřní změny způsobily celkově menší objem jehlic a to i přes to, že ošetření nemělo vliv na jejich délku (Albrechtová et al., 2007).

Back a Huttunen (1992) popsali vliv kyselých dešťů i na úrovni ultrastruktury chloroplastů. Chloroplasty mezofylu jehlice smrku ztepilého měly po umělé aplikaci kyselých dešťů menší obsah škrobu, granální systém byl stěsnaný ve středové části stromatu a nezasahoval do okrajových oblastí okolo membrán (Back a Huttunen, 1992). U podobně ošetřených listů sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) popsali Wen et al. (2011) ztenčení granálních tylakoidů a rozvolnění lamelárních tylakoidních struktur (Wen et al., 2011).

### **2.4.3. Alkalizace půdy**

Alkalizace půdy je další z faktorů, které ovlivňují růst a stavbu asimilačních orgánů stromů. Částečně jde o přirozený proces, kdy se v přírodě zvětráváním hornin zvyšuje v půdě koncentrace solí, uměle ji však navyšuje těžký průmysl. Lukjanova et al. (2013) zkoumali efekt alkalického znečištění prachem v okolí cementárny v Estonsku. Ačkoliv prach z cementárny již prakticky nevychází, půda si přesto alkalitu udržuje a ta má tedy dlouhodobý vliv na fyziologické procesy stromů rostoucích v okolí. Jehlice smrku ztepilého ze znečištěných míst měly větší celkovou plochu na řezu. Byla naměřena signifikantně tlustší pokožková vrstva na řezu a větší plocha mezofylu na řezu. Velké množství mezofylových buněk však bylo poškozených nebo úplně zničených. V jehlicích byla také naměřena nižší koncentrace chlorofylu. Fotosyntetický potenciál jehlice byl tedy nižší, než u jehlic stromů bez ošetření. Plocha cévních svazků na řezu byla signifikantně menší (Lukjanova et al., 2013). Stejně změny, avšak opačného charakteru, byly pozorovány na jehlicích borovice lesní rostoucí na tomtéž místě poblíž cementárny. Výsledky se shodovaly pouze v nárůstu plochy epidermis na řezu u obou druhů rostoucích v alkalickém prostředí (Lukjanova a Mandre, 2010;

Lukjanova et al., 2013). Celková plocha jehlice borovice lesní na řezu byla naopak menší, stejně tak jako plocha mezofylu na řezu, zatímco plocha cévních svazků na řezu narostla. Nárůst vodivých pletiv napomáhá rychlejšímu přesunu živin a vody a tím vytváření rezerv potřebných při působení stresu (Lukjanova a Mandre, 2010).

Alkalické prostředí také urychluje stárnutí jehlic. Jehlice borovice lesní rostoucí v půdě s vysokým pH dosáhly své maximální velikosti ve 2 letech, tedy o rok dříve, než za běžných podmínek. Jehlice tak rychleji přestávaly být sinkem a stávaly se zdrojem asimilátů dříve. Zároveň byly i odolnější vůči extrémním podmínkám (Lukjanova a Mandre, 2010). Dřívější výzkumy ukázaly, že smrk ztepilý je tolerantnější vůči alkalizaci půdy, než borovice lesní, proto mělo znečištění na stavbu jeho jehlice menší vliv (Mandre et al., 1999).

Alkalizace půdy může mít na strukturu jehlic i sekundární vliv. V okolí velkých elektráren či továren je častý problém s vysokou koncentrací těžkých kovů v půdě. Jelikož nemohou být biologicky degradovány v půdě, vstupují do rostlin, kde jsou využívány a ukládány, ve zvýšené míře však způsobují různé fyziologické změny. Bylo zjištěno, že vysoké pH půdy pozitivně ovlivňovalo míru a rychlost vstupu těžkých kovů do rostliny, přičemž jehlice byly hlavním místem, kde se ukládaly (u borovice lesní šlo hlavně o kovy Cr, Fe, Cu). Jejich nadměrná akumulace poté negativně ovlivňovala například výšku stromu, délku jehlice či počet jehlic ve svazku (Ots a Mandre, 2012).

Růst stromů v různých stresových podmínkách se projevuje nejen na změně poměru jednotlivých pletiv, ale také na jejich fyziologické a biochemické stavbě (Lukjanova a Mandre, 2010). Jak bylo zjištěno při výzkumu smrku černého (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P), celkový obsah nestrukturních sacharidů se u stromů postižených prachem z cementárny snížil, stejně tak jako obsah škrobu v jehlicích (Mandre, 2003).

Z nastudované literatury vyplývá, že pH půdy ovlivňuje stavbu jehlice i obsah škrobu v chloroplastech jehlice. Reakce na vysoce alkalické či kyselé prostředí se ukazuje jako druhově specifická, z výsledků však vyplývá, že obsah škrobu v chloroplastech je při působení těchto stresových faktorů nižší (Back a Huttunen, 1992; Mandre et al., 1999; Mandre, 2003; Albrechtová et al., 2007; Lukjanova a Mandre, 2010; Ots a Mandre, 2012; Lukjanova et al., 2013).

#### 2.4.4. Vliv koncentrace O<sub>3</sub>

Mezi velmi diskutovaná témata dnešní doby patří vliv ozonu (O<sub>3</sub>) na rostliny. Jeho koncentrace v atmosféře se neustále zvyšuje a za poslední století se více jak zdvojnásobila (Fowler et al., 1999). Ozon patří mezi látky s toxickým účinkem na rostliny, ohrožuje je hlavně v prvních fázích vývoje. Negativně působí na morfologii i anatomii listů. Zvýšená koncentrace O<sub>3</sub> má vliv na stavbu plazmatické membrány, konkrétně na složení fosfolipidových mastných kyselin. Změny na membráně pak negativně ovlivňují aktivitu ATP syntázy (Anttonen et al., 1996). Dále byl zkoumán vliv O<sub>3</sub> na koncentraci enzymu Rubisco, snížení jeho koncentrace v jehlicích bylo však pozorováno pouze při dlouhodobém působení O<sub>3</sub>. Projevila se ale negativní korelace mezi koncentrací O<sub>3</sub> a mírou karboxylace, což vysvětluje sníženou účinnost fotosyntézy při vystavení rostlin zvýšené koncentraci O<sub>3</sub> (Pell et al., 1992).

Mezi hlavní příznaky jehlic borovice halepské (*Pinus halepensis* Mill.) vystavené zvýšené koncentraci O<sub>3</sub> patřila chloróza jehlic s typickou mramorovou kresbou, projevilo se také zmenšení plochy mezofylu způsobené degradací jeho buněk (Soda et al., 2000). Jehlice smrku ztepilého poškozené ozonem měly v buňkách mezofylu menší chloroplasty a hustší a tmavší stroma (electron dense stroma) (Kivimäenpää et al., 2004). Koncentrace nestrukturních sacharidů se v listech buku lesního nebo jehlicích smrku ztepilého při ošetření O<sub>3</sub> nepatrně zvýšila. Naopak koncentrace škrobu v listech a jehlicích byla výrazně nižší. Jednotlivé stromy však mezi sebou vykazovaly velké rozdíly (Liu et al., 2004; Liu et al., 2005). Z nastudované literatury vyplývá, že tuto reakci ovlivňuje stáří jehlic, úživnost půdy, koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší, či to, zda strom roste v monokultuře nebo v kombinaci s jinými druhy (Kivimäenpää et al., 2004; Liu et al., 2004; Liu et al., 2005).

Koncentrace O<sub>3</sub> v ovzduší může mít na rostlinu také druhotný vliv. Při zkoumání příčiny žloutnutí jehlic smrku ztepilého bylo zjištěno, že ačkoliv žloutnutí způsobovala hlavně deficiencie Mg v půdě, zvýšená koncentrace O<sub>3</sub> tento efekt umocňovala. Vliv obou faktorů se také ukazoval jako synergický, při deficienci Mg a zvýšené koncentraci O<sub>3</sub> byl rozsah poškození několikanásobně vyšší, než při pouhém poškození O<sub>3</sub>. Vzhledem k designu experimentu, který probíhal v přirozeném prostředí, nešlo jednotlivé složky oddělit a popsat tak konkrétní vliv O<sub>3</sub> na žloutnutí jehlic smrku ztepilého (Siefermann-Harms et al., 2004).



Řada studií popisuje vliv kombinace zvýšené koncentrace  $O_3$  a  $CO_2$  na rostliny. Roční jehlice dospělých stromů borovice lesní, vystavených kombinaci zvýšené koncentrace  $O_3$  a  $CO_2$  po dobu jednoho roku, obsahovaly větší chloroplasty s většími škrobovými zrny, než jehlice bez ošetření. Rychlost fotosyntézy však byla potlačena, pravděpodobně kvůli vysoké saturaci sinků. Zároveň se projevoval opožděný nástup zimního otužování (Palomäki et al., 1996). Nárůst koncentrace škrobu v chloroplastech pozorovali i Utriainen et al. (2000) u ročních jehlic semenáčků borovice lesní po 2letém ošetření kombinací  $O_3$  a  $CO_2$ . Zvýšená koncentrace těchto dvou plynů navíc způsobovala žloutnutí a chlorózu 2letých jehlic. I v tomto případě byly pozorovány známky zpoždění zimního otužování kvůli opožděnému nárůstu obsahu taninů (Utriainen et al., 2000). Jak ukazují oba experimenty, zvýšená koncentrace  $CO_2$  nepomáhá zvrátit negativní změny způsobené zvýšenou koncentrací  $O_3$ .

Z nastudované literatury vyplývá, že na morfologii a anatomii jehlic, ultrastrukturu chloroplastů i obsah škrobu v jehlicích má vliv řada dalších faktorů. Jejich studování však přesahuje téma této diplomové práce, které je zaměřeno na vliv ozářenosti a zvýšené koncentrace  $CO_2$  na množství asimilačního škrobu v chloroplastech.

## 2.5. Metody zjišťování obsahu škrobu v chloroplastech

Následující kapitola se bude zabývat popisem technik, které umožňují kvantifikovat obsah škrobu v chloroplastech. Kromě popisovaných mikroskopických technik je možné obsah škrobu stanovit i pomocí biochemických metod.

### 2.5.1. Využití mikroskopických technik

Škrobová zrna v jehlicích smrku ztepilého jsou objekty o přibližné délce 0,5-10 $\mu$ m (Cabálková et al., 2008). Pro jejich sledování je možné využít různé typy mikroskopických technik. Světelná mikroskopie umožňuje díky svému rozlišení (přibližně 0,2  $\mu$ m) pozorovat struktury na úrovni organel. Chloroplasty jsou tedy dobře viditelné. Je možné určovat např. jejich velikost. Pro detailní pozorování konkrétních struktur v chloroplastu má však světelný mikroskop nedostatečné rozlišení. V porovnání s ostatními mikroskopickými technikami je výhodou světelné mikroskopie poměrně dobrá dostupnost a nízká cena (Kivimäenpää et al., 2004). Další možností při studiu chloroplastů je využití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Fluorescenční aktivita chlorofylu v chloroplastech smrku ztepilého navíc zůstává neměnná i po 5 letech uložení vzorků ve zmraženém stavu, vzorky je tedy možné vyhodnocovat i s časovým odstupem (Kubínová et al., 2014). Transmisní elektronová mikroskopie pak umožňuje detailní zkoumání chloroplastu s vizualizací jednotlivých vnitřních struktur, včetně škrobových zrn.

Existují další mikroskopické metody, kterými je možné pozorovat ultrastrukturu chloroplastů. Cabálková et al. (2008) použili kromě transmisní elektronové mikroskopie (TEM) i mikroskopii atomárních sil (AFM- Atomic Force Microscopy). Metoda AFM jim umožnila detailně pozorovat povrch škrobových zrn a rozlišit na něm povrchové struktury (Cabálková et al., 2008). Crumpton-Taylor et al. (2013) využívali metody fokusovaného iontového svazku (FIB - Focused Ion Beam). Mezi výhody této metody patří poměrně vysoká přesnost a rychlost díky automatickému vyhodnocování snímků. Nevýhodou je pak vysoká cena potřebného vybavení, při přípravě vzorků může také dojít k poškození buněk nebo jejich částí (Crumpton-Taylor et al., 2012).

## 2.5.2. Vyhodnocení ultrastruktury chloroplastu

Značná část studií, které se zabývají změnami v ultrastruktuře chloroplastů v reakci na různé faktory, popisuje tyto změny pouze kvalitativně. Autoři těchto studií tedy uvádějí, zda došlo ke zvětšení či zmenšení dané struktury apod. čistě na základě subjektivního pozorování. Pro přesné vyhodnocení vlivu různých faktorů na ultrastrukturu chloroplastů, a pro možnost porovnat je s jinými studii, je však potřeba tyto změny kvantifikovat pomocí nevychýlené metody. V této kapitole budou stručně představeny metody, které kvantitativní vyhodnocení ultrastruktury chloroplastů umožňují.

### 2.5.2.1. Stereologická metoda bodová

Stereologické metody umožňují získat nevychýlený odhad 3D strukturálních parametrů z 2D řezů. Měření a odhady parametrů se provádí na reprezentativní části vzorku, což výrazně šetří čas při získávání výsledků.

Pro určení kvantitativních parametrů ultrastruktury chloroplastů je možno použít jednu ze stereologických metod - metodu bodové mřížky. Stejná metoda byla využita např. při kvantifikaci chloroplastů v listech kukuřice seté (*Zea mays* L.) stresované chladem (Kutík et al., 2004; Kubínová a Kutík, 2007). Ve většině případů měly chloroplasty vystavené chladu větší objem, tvarově se však výrazněji nezměnily. Zároveň v nich bylo menší zastoupení systému tylakoidů. Poměr granálních a stromálních tylakoidů však zůstal zachován. V těchto chloroplastech se naopak zvýšilo poměrné zastoupení plastoglobulů (Kutík et al., 2004). Kutík et al. (1995) použili stejné metody bodové mřížky k vyhodnocení vlivu CO<sub>2</sub> na chloroplasty řepy červené (*Beta vulgaris* L.) při různé dostupnosti dusíku (Kutík et al., 1995).

Aby odhad co nejpřesněji odpovídal reálné hodnotě a předešlo se systematickým chybám, probíhá výběr vzorků u kvantitativních studií se stereologickým designem systematicky rovnoměrně náhodně. Využívá se k tomu testovací systém, na kterém jsou systematicky rovnoměrně rozloženy body či vzorkovací okénka, která se přiloží na měřený objekt tak, aby rovnoměrně zakrývala jeho povrch. Náhodnost je pak zajištěna příkládáním testovacího systému dle výběru čísla z tabulky náhodných čísel (Kubínová a Albrechtová, 1999).

## **2.5.2.2. Metody analýzy obrazu**

### **2.5.2.2.1. Automatické prahování struktur**

Tato metoda je založena na vytvoření binárního obrazu měřené struktury a její výhodou je poměrně rychlé vyhodnocení struktur. Podmínkou je však vysoký kontrast struktur či takové barevné složení obrazu, které umožňuje sledované struktury prahováním odlišit v barevné škále red-green-blue (RGB) nebo (u černobílých obrazů) ve škále stupňů šedi. Je třeba, aby měřené objekty měly přibližně stejnou intenzitu, která je ale odlišná od pozadí či jiných struktur. Pomocí počítačového programu jsou struktury, které jsou složeny z pixelů se stejným/podobným stupněm šedi, označeny, a je poté možné určit jejich parametry (obvod, plochu). Počítačové programy, které se pro tuto metodu využívají, jsou ImageJ, Ellipse, NISElements a další.

### **2.5.2.2.2. Interaktivní segmentace struktur**

Interaktivní segmentace se využívá k vyhodnocení digitálního obrazu vzorků, které nejsou dostatečně kontrastní nebo snadno odlišitelné od pozadí. Měřené struktury se v tomto případě ručně obkreslí a pomocí počítačového softwaru se u nich vypočítají požadovaná data (obvod, plocha). Tato metoda je ve srovnání se stereologickými metodami přesnější, jelikož se objekty měří s přesností na jednotlivé pixely.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Odběr materiálu

Výzkum této diplomové práce byl prováděn na smrku ztepilém (*Picea abies* (L.) Karst.). Stromy byly pěstovány v Experimentální stanici Laboratoře ekologické fyziologie rostlin, která je součástí CzechGlobe - Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i. a nachází se na Bílém Kříži v moravskoslezských Beskydech (49°33's.š., 18°32'v.d.; 908 m. n. m.). Zde byl od roku 2005 pěstován bukovo-smrkový porost ve dvou kultivačních sférách, které umožňují růst stromů při různé koncentraci CO<sub>2</sub> v ovzduší. Podrobný popis kultivačních sfér je uveden v práci Urban et al., 2001.

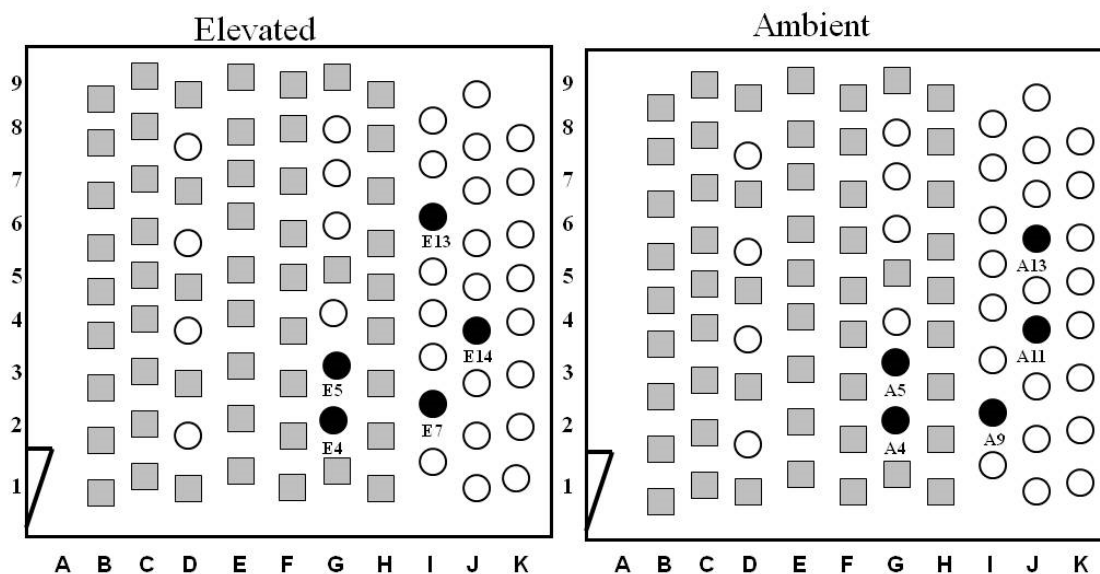
Kultivační sféry tvoří železná konstrukce s automaticky ovládanými skleněnými okny (Obr. 3.1). Celková velikost obou komor je 10x10m, výška v nejvyšším bodě dosahuje 7m. Takto velká plocha umožňuje pěstování přibližně 120 juvenilních stromů. V těchto sférách jsou nastaveny podmínky, které co nejvíce odpovídají přirozenému prostředí. Skleněná okna jsou automaticky otevírána dle potřeby, teplota a vlhkost vzduchu jsou zde oproti vnějšímu prostředí změněny minimálně. Železná konstrukce a okna však snižují dopad slunečního záření o 26 %, oproti venkovním podmínkám (Urban et al., 2001).

Kontrolovaným parametrem byla koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší. V první komoře zůstávaly stromy při běžné atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub>, ta v době trvání experimentu dosahovala 382-395 ppm (Recent monthly mean CO<sub>2</sub> at Mauna Loa; <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>). Ve druhé komoře byly stromy vystaveny zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>, která měla po celou dobu hodnotu přibližně 700 ppm.



Obr. 3.1 Letecký snímek experimentální stanice Bílý Kříž, pohled na dvě kultivační sféry. Zdroj: <http://www.czechglobe.cz/>

V roce 2005 byly do kultivačních sfér přesazeny oba druhy stromů ve stáří 5 let. Odběr vzorků pro tento výzkum proběhl v roce 2011 z 11 let starých smrků, které byly vystaveny ošetření po dobu 6 let. Odběr vzorků probíhal 4. října mezi 13:00 a 14:00. Počasí bylo ten den oblačné. Z každé sféry bylo vybráno 5 stromů, které nejevily žádné známky poškození, onemocnění či růstové anomálie (Obr. 3.1). Z těchto reprezentativních stromů byly z jižní strany odebrány jehlice 1. ročníku, a to jak jehlice slunné, tak jehlice stinné, které rostly v přirozeném zastínění horními patry koruny.



Obr. 3.2 Schéma rozmístění stromů v kultivačních sférách. Elevated značí sféru se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>, ambient značí sféru s atmosférickou koncentrací CO<sub>2</sub>. Kolečka znázorňují smrk ztepilý, čtverce buk lesní. Označení stromů E – zvýšená (elevated) koncentrace CO<sub>2</sub>, A – atmosférická (ambient) koncentrace CO<sub>2</sub>, čísla 4-14 označují čísla stromů

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii

Z odebraných jehlic byly z jejich střední části vykrojeny segmenty dlouhé přibližně 1mm. Tyto segmenty byly ihned fixovány v 5% roztoku glutaraldehydu v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7,3). Po transportu do laboratoře byly vzorky zpracovány pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) dle protokolu (Tab. 3.1). Ke zpracování vzorků byl využit automatický mikrovlnný procesor (Leica EM AMW, Leica Microsystems, Vídeň, Rakousko). Po fixaci 5% roztokem glutaraldehydu byly vzorky promyty v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7.3) a následně postfixovány v 2% roztoku oxidu osmičelého. Poté byly vzorky znovu promyty stejným puftrem a voda ve vzorcích byla postupně nahrazena acetonem. Dále byly vzorky infiltrovány epoxidovou

pryskyřici podle Spurra (Spurr, 1969). Na závěr byly vzorky ručně zality do čerstvé pryskyřice do bločků a polymerovány při teplotě 70°C po dobu 48 hod.

Ultratenké řezy o tloušťce 70-80 nm byly připraveny na ultramikrotomu (Leica EM UC7, Leica Microsystem, Vídeň, Rakousko) a poté přeneseny na měděné sloty o průměru 3mm. Sloty byly potaženy formvarovou membránou a uprostřed měly oválný otvor o rozměru 1x2 mm, který umožnil pozorování celého průřezu jehlicí. Vzorky byly pozorovány na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL-JEM-1011 (JEOL, Tokyo, Japonsko) a obrázky vybraných, mediánně říznutých chloroplastů, byly snímány pomocí CCD kamery Veleta s aktivizačním softwarem Olympus (Olympus, Soft Imaging Solution GmbH, Munster, Německo) při rozlišení 2048x2048 a zvětšení 20-25 000x.

Vzhledem k zaměření mého studia na Učitelství biologie pro střední školy, nižšímu kreditovému hodnocení, nižší časové dotaci a menšímu zadanému rozsahu pro diplomovou práci, jsem se z výše popsaných procesů osobně účastnila pozorování a snímání několika řezů na TEM. Řezy a snímky chloroplastů připravila RNDr. Barbora Radochová, Ph.D., která je zároveň konzultantkou této diplomové práce.



ampulka	krok (opakování)	Čas (min)	max. teplota (°C)	Činidlo	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 k procesu zpracování vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii. GA – glutaraldehyd, Režimy záření - kont. = rychlý nárůst teploty a poté její udržování, svah = značí pomalý nárůst teploty v zadaném čase, puls = rychlý nárůst teploty po nastavenou hodnotu, poté vypnutí záření a pokles teploty o 5°C, poté opětovné zapnutí záření a nárůst teploty na nastavenou hodnotu.

### **3.2.2. Metody výběru chloroplastů pro měření**

Pro měření procentuálního zastoupení škrobu v chloroplastech bylo potřeba vybrat dostatečný počet chloroplastů z příčného řezu jehlicí. Při výběru chloroplastů bylo postupováno dvěma různými metodami, jejichž výsledky byly následně porovnány. Byly měřeny chloroplasty vybrané pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy příčného řezu jehlicí (3.2.2.1) a chloroplasty nacházející se na řezu jehlicí v první vrstvě mezofylu pod pokožkou (3.2.2.2).

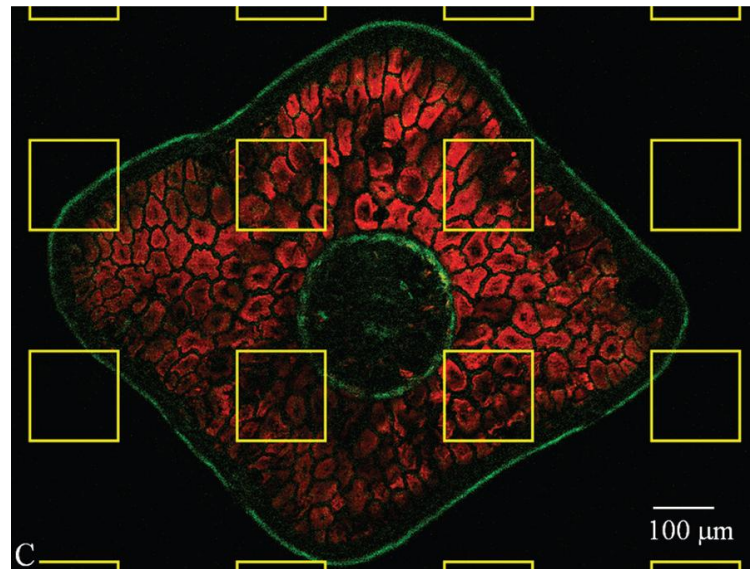
#### **3.2.2.1. Metoda výběru chloroplastů z celé plochy příčného řezu**

Při tomto postupu bylo využito metody systematicky rovnoměrně náhodného výběru pozic (SRN), která umožňuje získat nevychýlené odhady daných parametrů. Při použití této metody má každá část příčného řezu jehlicí, tedy i každý chloroplast, stejnou pravděpodobnost, že bude vybrána pro měření. Metoda spočívá ve vložení mřížky se vzorkovacími okénky na snímek získaný při malém zvětšení (100x). Vzorkovací okénka mají přesně definované rozměry, rozestup a hustotu. Tato okénka jsou na mřížce uspořádána systematicky a jsou rozložena rovnoměrně tak, aby pokrývala celou plochu řezu (Obr. 3.3; 3.4). Náhodnost zajišťuje přiřkládání mřížky podle tabulky náhodných čísel. Ke vložení mřížky stejně jako k následnému měření chloroplastů byl využíván program Ellipse 2.08 (ViDiTo, Košice, Slovensko). Nasnímány při větším zvětšení (20-25 000x) a dále vyhodnocovány byly ty chloroplasty, které se nacházely ve středu vzorkovacího okénka. Hustota mřížky byla volena tak, aby do řezu zasahovalo nejméně pět okének. V případě tohoto výběru se počet chloroplastů pohyboval mezi sedmi a čtrnácti v závislosti na velikosti řezu.

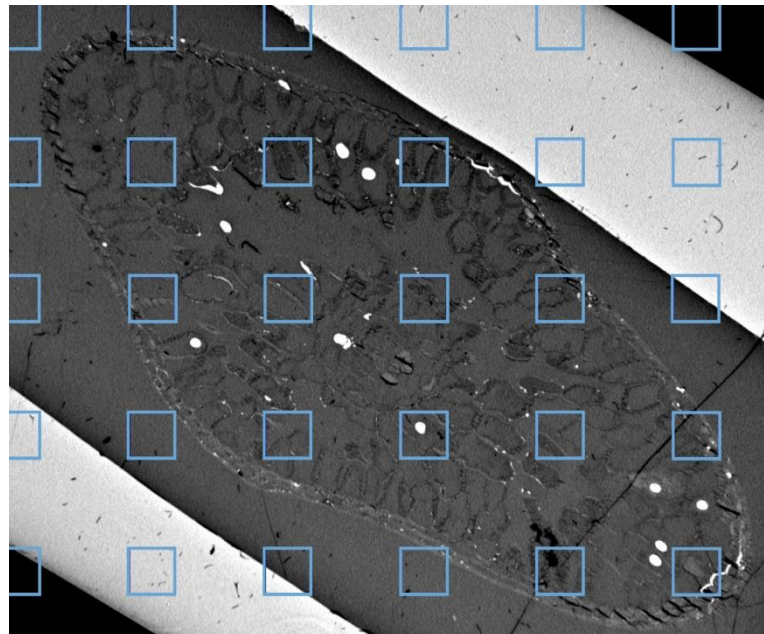
#### **3.2.2.2. Metoda výběru chloroplastů z první vrstvy mezofylu pod pokožkou**

Zcela jiný postup byl použit při výběru chloroplastů z první vrstvy mezofylu. V tomto případě bylo vybráno sedm (stinné jehlice) nebo čtrnáct (slunné jehlice) chloroplastů, které se nacházely v první vrstvě buněk mezofylu pod vrstvou

hypodermis. Chloroplasty byly vybírány rovnoměrně z celého obvodu jehlice z každé 3. až 5. buňky, podle počtu buněk na řezu. Chloroplasty byly následně snímány při zvětšení 20-25 000x.



Obr. 3.3 Schéma systematicky rovnoměrně náhodného výběru pozic na příčném řezu jehlicí smrku ztepilého. Snímek z konfokálního mikroskopu. Převzato z: Kubínová et al, 2014

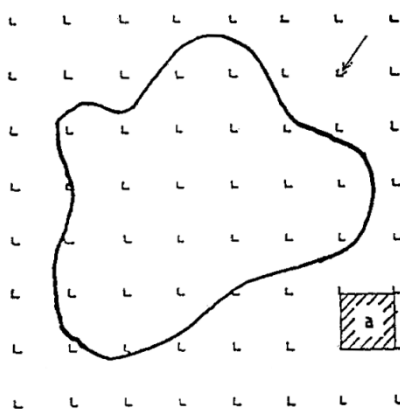


Obr. 3.4 Systematicky rovnoměrně náhodný výběru pozic na příčném řezu jehlicí smrku ztepilého. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu. Zdroj: autorka

### 3.2.3. Vyhodnocení zastoupení škrobu pomocí stereologické metody bodové mřížky

Aby bylo možné určit poměrné zastoupení škrobu v chloroplastech, je potřeba stanovit plochu celého chloroplastu a plochu škrobového zrna. Pro tato měření byly využity dvě metody - stereologická metoda bodové mřížky a metoda interaktivní segmentace.

Metoda bodové mřížky využívá k odhadu struktur testovacího systému (mřížky) složeného z bodů. Body jsou pravidelně uspořádány a je tedy známá plocha odpovídající jednotce testovacího systému (Obr. 3.5). Bodová mřížka se přiloží na řez objektem a následně se spočítají body zasahující do měřené struktury. Hustota bodů je zvolena tak, aby do struktury zasahovalo nejméně 100 bodů. Pro výpočet plochy je použit vzorec  $estA = P \times a$ , přičemž  $P$  je počet bodů zasahujících do struktury,  $a$  udává plochu jednotky testovacího systému (Wiebel, 1979).

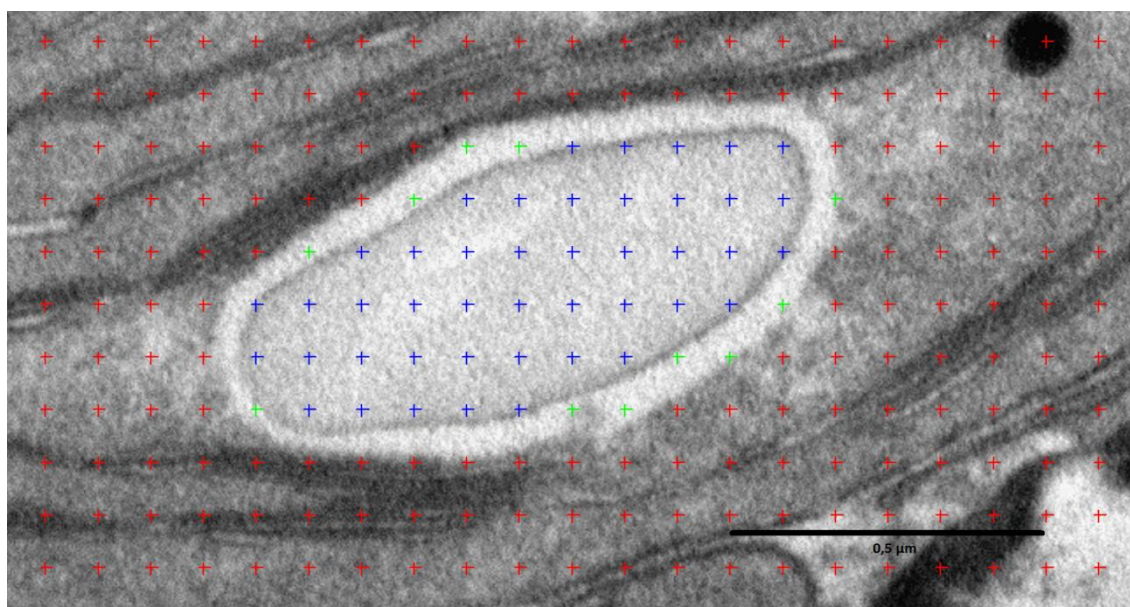


Obr. 3.5 Znárodnění odhadu plochy pomocí metody bodové mřížky. a- udává plochu jednotky testovacího systému. Převezato z: Kubínová a Albrechtová, 1999

Pro měření bodovou metodou je možné použít speciální počítačové programy, např. program Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovensko), nebo volně dostupný freeware ImageJ s použitím plug-inu Linsys.

V rámci této diplomové práce byla pro stanovení plochy chloroplastů a škrobové zrna použita stereologická metoda bodové mřížky. Měření bylo provedeno

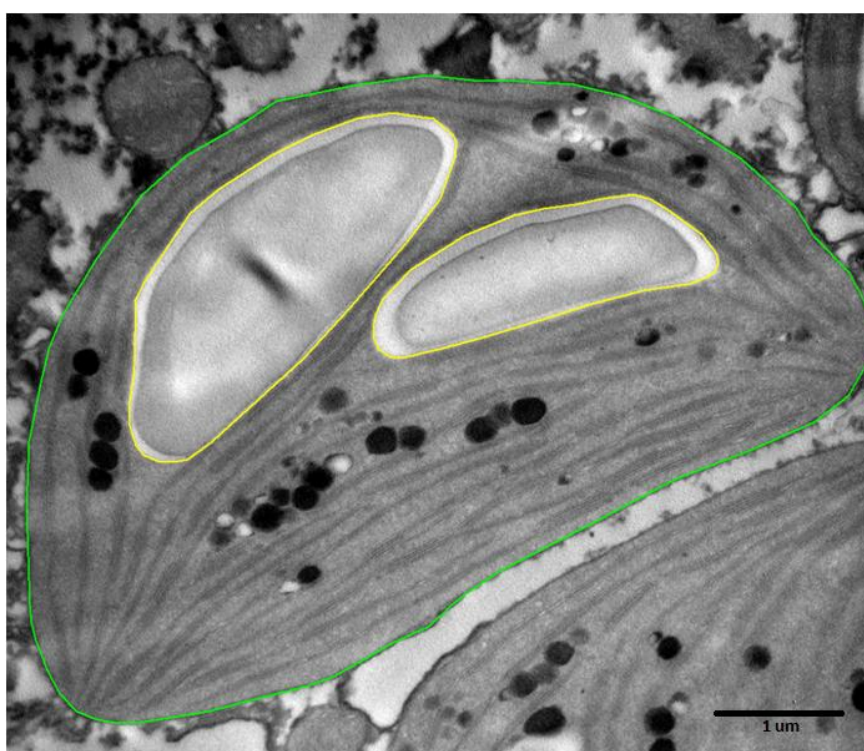
v počítačovém programu Ellipse 2.08 (ViDiTo, Košice, Slovensko). Ten mimo jiné umožňuje využívání vícevrstevné mřížky (PointGrid MultiForegroundGrid), díky čemuž je možné měřit zároveň až 4 různé struktury na jednom vzorku. Jednotlivé mřížky lze během měření přepínat. Při výzkumu pro tuto práci byly využity dvě mřížky s různou hustotou bodů, jedna pro měření plochy chloroplastu, druhá pro měření plochy škrobového zrna (Obr. 3.6). Při použití této metody je pro dostatečnou přesnost měření zapotřebí mít alespoň 100 zásahů do měřené struktury. Vzhledem k tomu, že škrobová zrna byla různě velká, do struktury často nezapadalo potřebných 100 bodů, a bylo potřeba často měnit hustotu mřížky, což bylo časově náročné. Z toho důvodu bylo od této metodiky upuštěno a k měření se začala využívat metoda interaktivní segmentace.



Obr. 3.6 Bodová mřížka přiložená na příčný řez chloroplastem. Modré křížky znázorňují zásah do struktury škrobového zrna, zelené křížky do dvůrku škrobového zrna, který je jeho součástí, červené křížky značí zásah mimo strukturu zrna. Úsečka udává měřítko 0,5 $\mu$ m. Zdroj: autorka

### 3.2.4. Vyhodnocení zastoupení škrobu pomocí metody interaktivní segmentace

Jelikož jsou měřené objekty (chloroplast, škrobové zrna), celkově konzistentního tvaru, začala jsem využívat metodu interaktivní segmentace. Při použití této metody se objekt v programu Ellipse 2.08 (ViDiTo, Košice, Slovensko) ručně obkreslí, program pak automaticky spočítá jeho plochu (Obr. 3.6). Tímto postupem se výrazně zkrátí čas měření a došlo také ke zpřesnění vyhodnocování, jelikož byla plocha změřena, ne jen odhadnuta.



Obr. 3.6 Vyhodnocení plochy chloroplastu a škrobového zrna metodou interaktivní segmentace. Zelená linka ohraničuje chloroplast, žlutá škrobová zrna. Úsečka udává měřítko 1 μm. Zdroj: autorka

### 3.3. Statistika

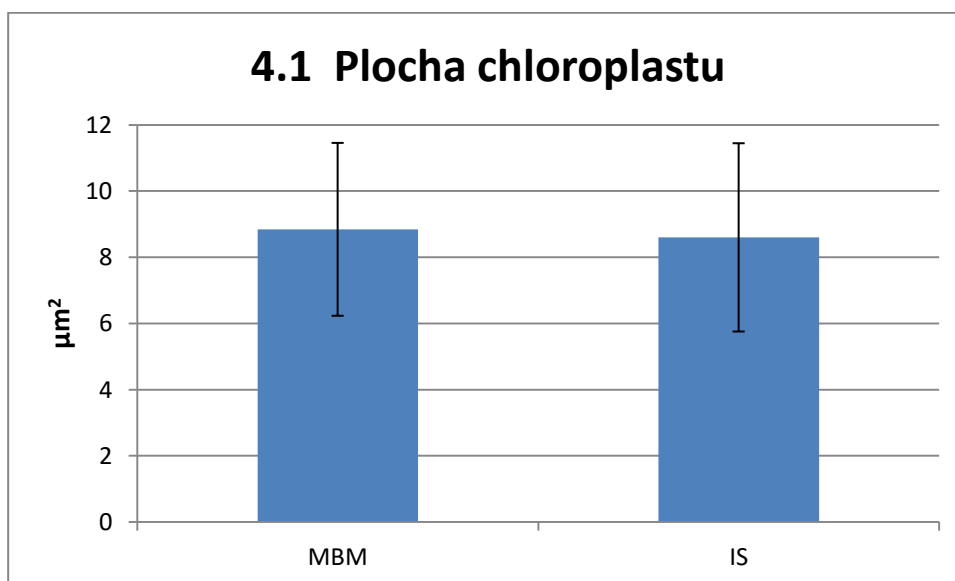
Výsledky měření byly vyhodnoceny pomocí následujících statistických metod. Pro vyhodnocení vlivu ozáření a CO<sub>2</sub>, stejně jako pro porovnání vzorků vybíraných metodou SRN a z první vrstvy mezofylu, byl použit dvouvýběrový t-test v programu NCSS 2000 (NCSS, USA). Dále byla pro vyhodnocení vlivu ozáření a CO<sub>2</sub> opět v programu NCSS 2000 použita analýza rozptylu dvojného třídění ANOVA (Repeated

Measures Analysis Variant), kdy jako faktory třídění byla použita růstová koncentrace CO<sub>2</sub> a ozářenost. Díky typu testu Repeated Measures bylo možno zohlednit fakt, že z jednoho stromu byly odebrány slunné a stinné jehlice, pozorování tedy nebyla nezávislá a v provedení testu byly hodnoty shlukovány vždy podle příslušnosti k danému jedinci. Za statisticky průkazné byly vyhodnoceny u obou typů testů rozdíly na hladině pravděpodobnosti  $p < 0,05$ .

## 4. Výsledky

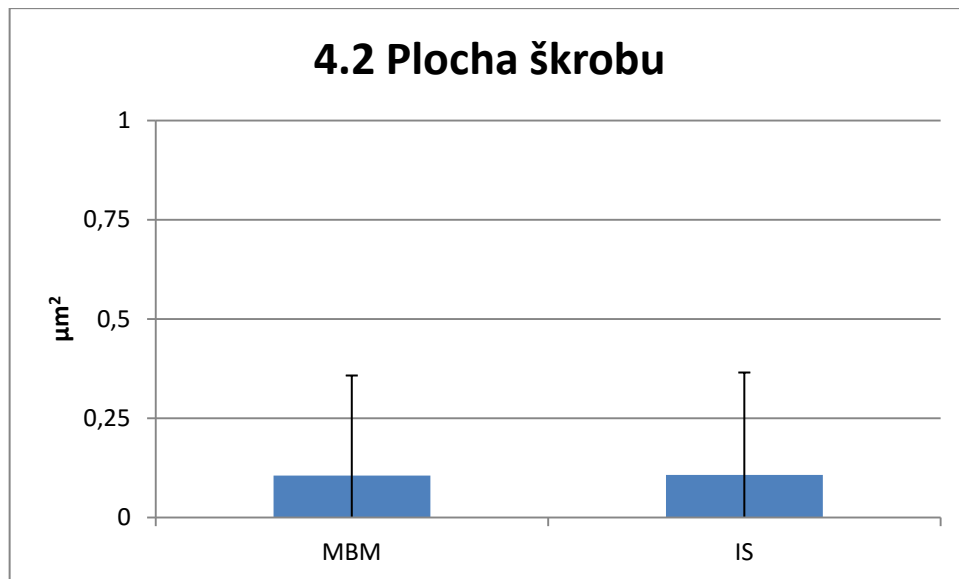
### 4.1. Optimalizace metod pro kvantifikaci ultrastruktury chloroplastů

Pro vyhodnocení snímků z transmisního elektronového mikroskopu jsem používala dvě metody – stereologickou metodu bodové mřížky a metodu interaktivní segmentace. Výsledky sledovaných kvantitativních parametrů (plocha chloroplastu, plocha škrobového zrna, podíl škrobu) z obou metod mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl a jsou tedy záměnné (Graf 4.1, 4.2). Na základě tohoto závěru probíhala všechna další měření za využití metody interaktivní segmentace, která je časově úspornější a pro vyhodnocování tak kompaktních struktur, jako jsou chloroplasty a škrobová zrna, výhodnější.



Graf 4.1 – Porovnání metod vyhodnocování plochy chloroplastu na mediánním řezu. MBM – stereologická metoda bodové mřížky, IS – metoda interaktivní segmentace. Statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  nebyl zaznamenán, měřeno párovým t-testem. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

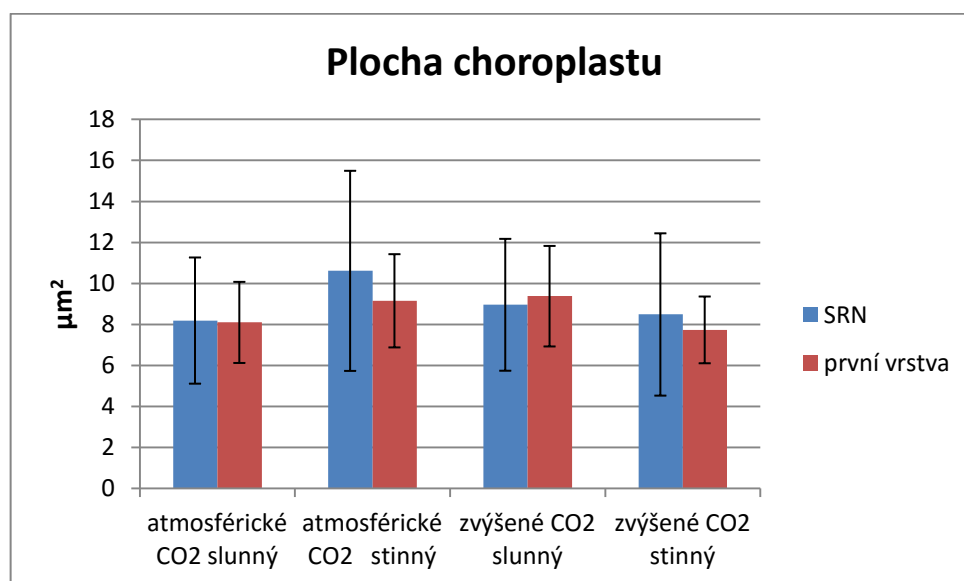




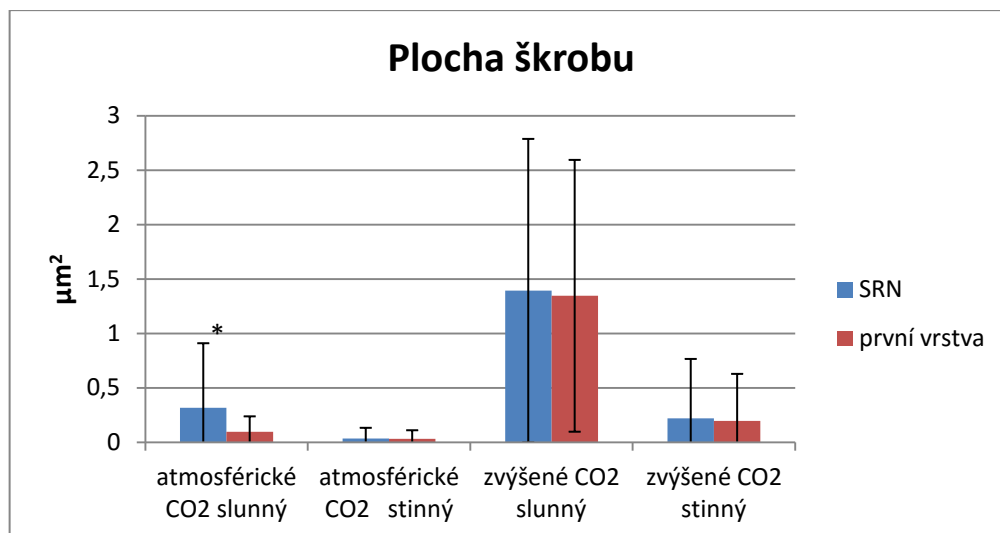
Graf 4.2 – Porovnání metod vyhodnocování plochy škrobového zrna na mediáním řezu chloroplastem. MBM – stereologická metoda bodové mřížky, IS – metoda interaktivní segmentace. Statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  nebyl zaznamenán, měřeno párovým t-testem. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

## 4.2. Reprezentativnost první vrstvy mezofylu pod pokožkou pro kvantifikaci škrobu

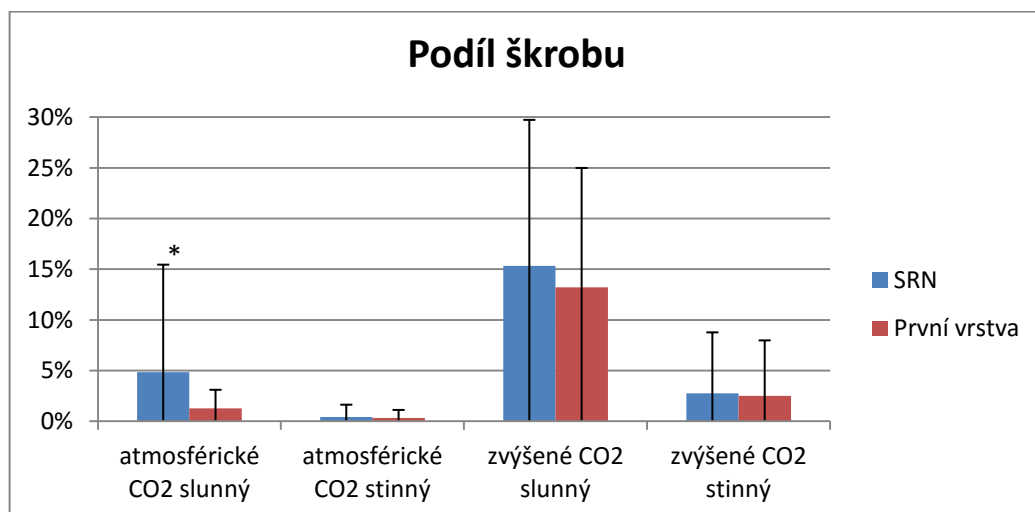
Pro vyhodnocení sledovaných kvantitativních parametrů chloroplastů byly vybírány snímky chloroplastů z první vrstvy mezofylu pod pokožkou (první vrstva) a poté systematicky rovnoměrně náhodně z celé plochy mezofylu (SRN). Výsledky z těchto dvou typů výběrů pozic se od sebe signifikantně lišily pouze v případě měření slunných jehlic rostoucích za atmosférických podmínek CO<sub>2</sub>. I když se plocha samotných chloroplastů signifikantně nelišila (Graf 4.3), u slunných jehlic vystavených zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> byla metodou SRN naměřena větší plocha škrobových zrn, než při měření pouze první vrstvy (Graf 4.4). Podíl škrobu pak také vykazoval při stejné kombinaci faktorů statisticky významný rozdíl (Graf 4.5). Za ostatních kombinací faktorů ozáření a koncentrace CO<sub>2</sub> se výsledky měření snímků z první vrstvy statisticky významně nelišily od výsledků z celé plochy mezofylu.



Graf 4.3 – Plocha chloroplastu na mediánním řezu v závislosti na místě odběru vzorků. SRN - vzorky odebírány pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy mediánního řezu jehlicí. První vrstva - vzorky odebírány z první vrstvy mezofylu pod pokožkou. Atmosférické CO<sub>2</sub> - aktuální koncentrace CO<sub>2</sub>, zvýšené CO<sub>2</sub> – zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, stinný – stinná jehlice, slunný – slunná jehlice. Svislá osa vyznačuje naměřené hodnoty v μm<sup>2</sup>. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. Statisticky významný rozdíl při p<0,05 nebyl zaznamenán.



Graf 4.4 – Plocha škrobu na mediáním řezu chloroplastem v závislosti na místě odběru vzorků. SRN - vzorky odebírány pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy mediáním řezu jehlicí. První vrstva - vzorky odebírány z první vrstvy mezofylu pod pokožkou. Atmosférické CO<sub>2</sub> - aktuální koncentrace CO<sub>2</sub>, zvýšené CO<sub>2</sub> – zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, stinný – stinná jehlice, slunný – slunná jehlice. Svislá osa vyznačuje naměřené hodnoty v  $\mu\text{m}^2$ . Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. \* - signifikance označující statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$ .

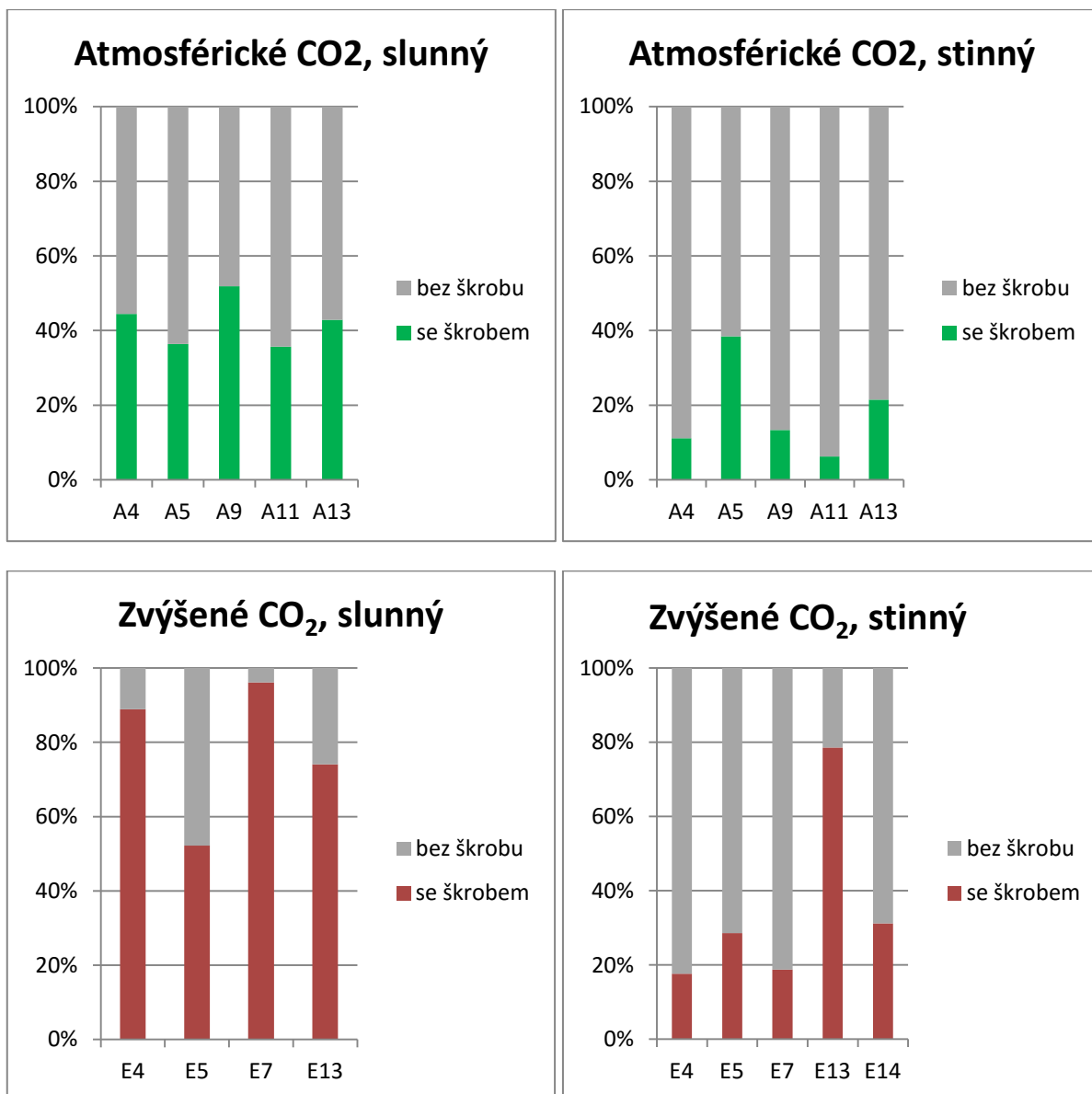


Graf 4.5 – Poměrné zastoupení škrobových zrn na mediáním řezu chloroplastem v závislosti na místě odběru vzorků. SRN - vzorky odebírány pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy mediáním řezu jehlicí. První vrstva - vzorky odebírány z první vrstvy mezofylu pod pokožkou. Atmosférické CO<sub>2</sub> - aktuální koncentrace CO<sub>2</sub>, zvýšené CO<sub>2</sub> – zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, stinný – stinná jehlice, slunný – slunná jehlice. Svislá osa vyznačuje průměr naměřených hodnot. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. \* - signifikance označující statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$ .

### **4.3. Poměrné zastoupení chloroplastů se škrobovými zrny vztažené k jednotlivým stromům**

Při vyhodnocování jednotlivých vzorků jsem pozorovala velké množství chloroplastů, které neobsahovaly škrob. Rozhodla jsem se podrobněji zaměřit na to, zda je tento fakt podmíněný mírou ozáření či koncentrací  $\text{CO}_2$ , a vyhodnotila četnosti škrobových zrn při různých kombinacích vnějších faktorů.

Následující grafy 4.5 - 4.8 znázorňují procentuální zastoupení chloroplastů se škrobovými zrny, rozdělené dle vlivu vnějších faktorů. Jednotlivé stromy vykazují vysokou variabilitu, jsou však pozorovatelné jisté trendy. Při atmosférické koncentraci  $\text{CO}_2$  bylo chloroplastů se škrobovými zrny výrazně méně, než v případě stromů rostoucích při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$ . Zároveň má na obsah škrobu v chloroplastech vliv ozáření. Ve slunných jehlicích bylo více chloroplastů, které obsahovaly škrob, naopak ve stinných jehlicích byl větší počet chloroplastů bez škrobových zrn (Grafy 4.5 - 4.8). Ve většině případů, kdy chloroplasty obsahovaly škrob, bylo pozorovatelné jedno škrobové zrno, malé množství chloroplastů obsahovalo dvě či tři zrna.



Grafy 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 – Procentuální zastoupení chloroplastů se škrobovými zrny vztahované k jednotlivým stromům. Atmosférické CO<sub>2</sub> - aktuální koncentrace CO<sub>2</sub>, zvýšené CO<sub>2</sub> - zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, slunný – slunná jehlice, stinný – stinná jehlice. Bez škrobu – chloroplasty, které neobsahovaly žádná škrobová zrna. Se škrobem – chloroplasty, které obsahovaly škrobová zrna. Svislá osa vyznačuje procenta měřených vzorků. A4-A13 a E4-E14 označuje čísla stromů (např. A4 = strom č. 4 rostoucí při aktuální koncentraci CO<sub>2</sub>).

#### **4.4. Vyhodnocení vlivu ozáření a koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší na ultrastrukturu chloroplastů**

Následující text shrnuje výsledky měření vlivu dvou vnějších faktorů a jejich kombinací na plochu chloroplastu, plochu škrobového zrna a podíl škrobu v chloroplastech. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 4.1), a znázorněny v grafech (Graf 4.9-4.14)

Sledované vnější faktory neměly na plochu chloroplastů z první vrstvy mezofylu pod pokožkou výrazný vliv (Graf 4.9). Při výběru chloroplastů pomocí SRN však byla zjištěna při atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub> větší plocha mediánního řezu chloroplastů stinných jehlic, oproti slunným. Naopak při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> byla plocha chloroplastů ze slunných jehlic větší, než z jehlic stinných (Graf 4.10).

Co se týče plochy škrobu, byly trendy výsledků shodné u obou typů výběrů pozic. Za atmosférické koncentrace se plocha škrobových zrn významně nelišila při různé ozáření. Při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> však měla ozáření na plochu škrobových zrn prokazatelný vliv, chloroplasty ze slunných jehlic obsahovaly výrazně více škrobu (Graf 4.11, 4.12). Počet škrobových zrn se však nezvyšoval, chloroplasty většinou obsahovaly pouze jedno zrno.

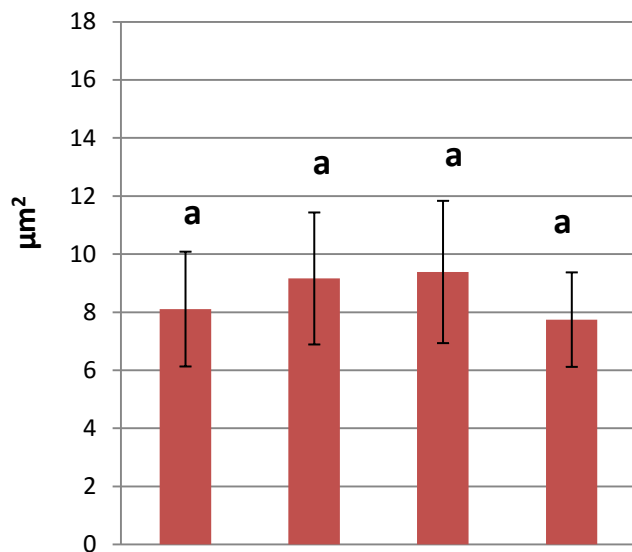
Na podíl škrobu neměla při atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub> ozáření vliv, podíl škrobu zůstával relativně nízký. Při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> byl však významný rozdíl mezi chloroplasty ze slunné a stinné jehlice. Při vyšší ozáření se podíl škrobu výrazně navýšil. Rozdíly výsledků byly v tomto případě stejné u obou typů výběru vzorků (Graf 4.13, 4.14).

Při porovnání vnějších faktorů má na kvantitativní parametry chloroplastu větší vliv ozáření, než koncentrace CO<sub>2</sub>. V případě plochy chloroplastu a plochy škrobového zrna je také významně průkazná interakce těchto dvou faktorů (Tabulka 4.1).

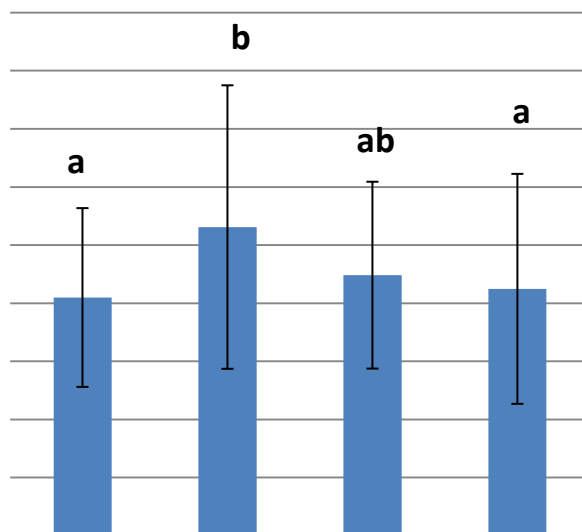
		První vrstva		SRN	
	FAKTOR	p-hodnota	signifikance	p-hodnota	signifikance
Plocha chloroplastu	ozářenost	0,610249	n.s.	0,044753	*
	CO <sub>2</sub>	0,913187	n.s.	0,343599	n.s.
	Interakce	0,043651	*	0,008533	**
Plocha škrobu	ozářenost	0,000018	***	0,000134	***
	CO <sub>2</sub>	0,016805	*	0,012658	*
	Interakce	0,000040	***	0,002442	**
Podíl škrobu	ozářenost	0,027189	*	0,004349	**
	CO <sub>2</sub>	0,212353	n.s.	0,030938	*
	Interakce	0,285416	n.s.	0,615770	n.s.

Tabulka 4.1 – Hodnocení vlivu koncentrace CO<sub>2</sub> a ozáření na poměrné zastoupení škrobových zrn, plochu chloroplastu a plochu škrobových zrn na mediánním řezu chloroplastem. První vrstva - vzorky odebírány z první vrstvy mezofylu pod pokožkou. SRN - vzorky odebírány pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy mediánního řezu jehlicí. Ozáření – vliv ozáření, CO<sub>2</sub> – vliv koncentrace CO<sub>2</sub>. P-hodnota udává hladinu pravděpodobnosti zamítnutí nulové hypotézy H<sub>0</sub>. Signifikance označuje statisticky významný rozdíl; označení \* při p<0,05; \*\* při p<0,01; \*\*\* při p<0,001; n.s. značí nesignifikanční rozdíl. Výsledky analýzy rozptylu ANOVA Repeated measures.

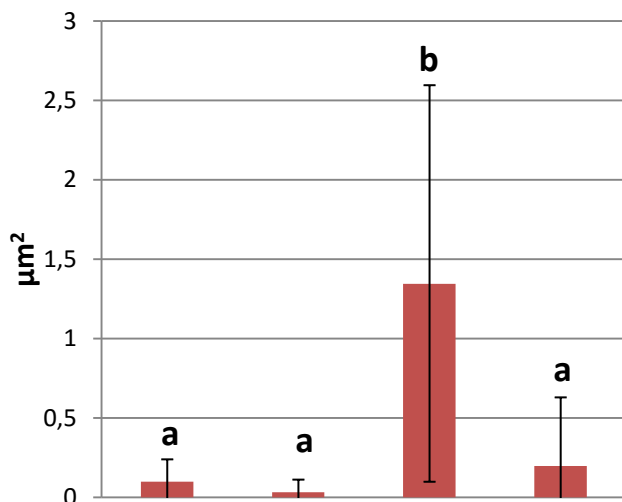
**4.9 Plocha chloroplastu - 1. vrstva**



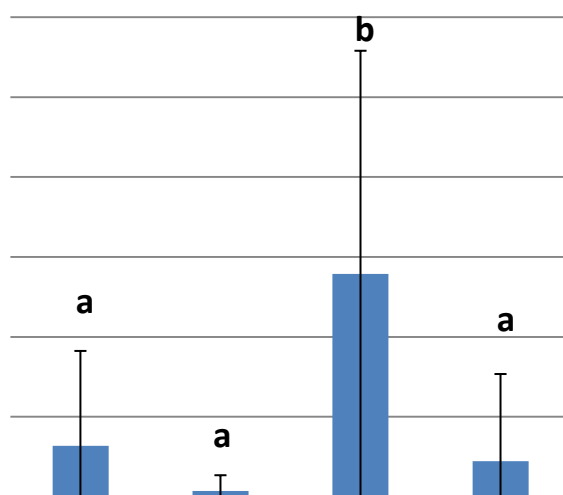
**4.10 Plocha chloroplastu - SRN**



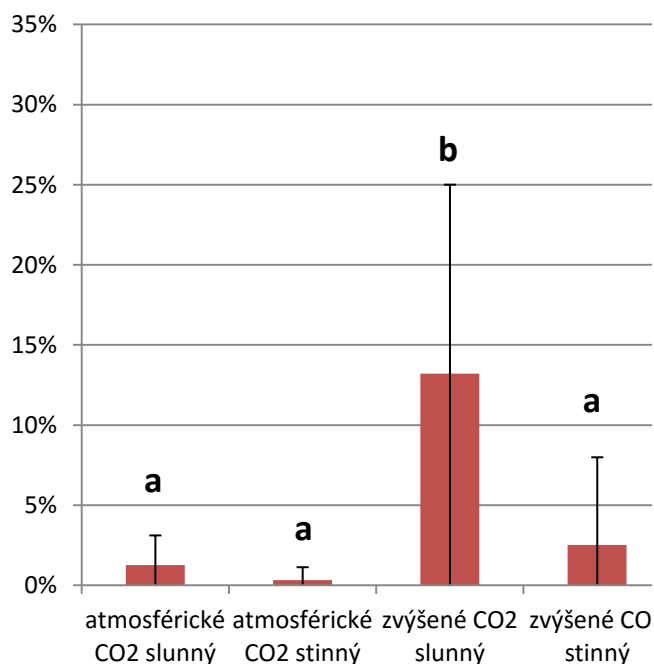
**4.11 Plocha škrobu - 1. vrstva**



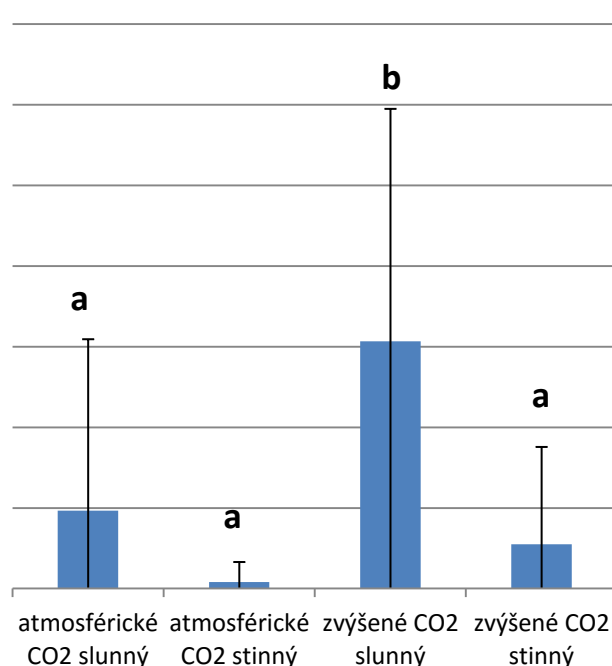
**4.12 Plocha škrobu - SRN**



**4.13 Podíl škrobu - 1. vrstva**



**4.14 Podíl škrobu - SRN**





Graf 4.9 - Plocha chloroplastu na mediánním řezu. První vrstva - vzorky odebírány z první vrstvy mezofylu pod pokožkou.

Graf 4.10 - Plocha chloroplastu na mediánním řezu. SRN - vzorky odebírány pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy mediánního řezu jehlicí.

Graf 4.11 - Plocha škrobového zrna na mediánním řezu chloroplastem. První vrstva - vzorky odebírány z první vrstvy mezofylu pod pokožkou

Graf 4.12 - Plocha škrobového zrna na mediánním řezu chloroplastem SRN - vzorky odebírány pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy mediánního řezu jehlicí.

Graf 4.13 - Poměrné zastoupení škrobových zrn na mediánním řezu chloroplastem. První vrstva - vzorky odebírány z první vrstvy mezofylu pod pokožkou.

Graf 4.14 - Poměrné zastoupení škrobových zrn na mediánním řezu chloroplastem. SRN - vzorky odebírány pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru z celé plochy mediánního řezu jehlicí.

Atmosférické CO<sub>2</sub> - aktuální koncentrace CO<sub>2</sub>, zvýšené CO<sub>2</sub> – zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, stinný – stinná jehlice, slunný – slunná jehlice. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku. Písmena nad grafy značí statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  (Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test).

## 5. Diskuse

V následující kapitole budou výsledky získané v rámci této diplomové práce porovnávány a diskutovány s informacemi nalezenými v literatuře. Osnova diskuse bude kopírovat řazení výsledků. Nejprve bude diskutována vhodnost zvolené metodiky, dále pak vliv ozáření a koncentrace CO<sub>2</sub> na kvantitativní parametry chloroplastu a škrobového zrna jehlice smrku ztepilého.

### 5.1. Metodika

#### 5.1.1. Experimentální systémy

Růst rostlin v kontrolovaných podmínkách s možností nastavení koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší umožňuje celá řada experimentálních systémů. V případě dlouhodobého experimentu na dřevinách se však nabídka zužuje z důvodu náročnosti na prostor i finance. Jednou z možností je využití komor různé stavby a velikosti, ve kterých je možné kontrolovat koncentraci CO<sub>2</sub> a teplotu (Kellomaki et al., 2000). Pro výzkum této diplomové práce byly použity kultivační sféry s železnou konstrukcí a automaticky nastavitelnými okny. Takováto konstrukce umožňuje udržovat požadovanou koncentraci CO<sub>2</sub> při relativně malé spotřebě dodaného CO<sub>2</sub> (Urban et al., 2001). V průběhu experimentu byla v jedné komoře koncentrace CO<sub>2</sub> odpovídající současné koncentraci v atmosféře, tj. 382-395 ppm (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>), ve druhé byla nastavena na 700ppm (zvýšená koncentrace). Jednou z největších výhod tohoto experimentálního systému je růst rostlin v zapojeném porostu společně s podrostem a bez omezení kořenového systému kultivačním kontejnerem. Mezi měřenými stromy tak probíhají přirozené interakce, které se blíží přirozené situaci v lese. Nevýhodou je snížení množství dopadajícího slunečního záření o 26 % vlivem zastínění porostu železnými lamelami, či kvůli jeho filtraci přes skleněná okna. Teplota a vlhkost vzduchu ve sférách se však od vnějšího prostředí výrazněji neliší (Urban et al., 2001).

I přes částečnou redukci dopadajícího záření však stromy vytvářely v daném experimentálním materiálu slunný a stinný ekotyp jehlic. Tato diferenciace je patrná již

od morfologické úrovně (Lhotáková et al., 2012), až na úroveň ultrastruktury (Radochová et al., 2013). Při studii na smrku ztepilém měly slunné jehlice smrku větší objem, větší vnitřní plochu jehlice, ale také vyšší poměrné zastoupení objemu mezofylu a středního válce, než stinné jehlice. Naopak poměrné zastoupení objemu epidermis a hypodermis bylo vyšší u stinných jehlic (Lhotáková et al., 2012). Studie na listech buku lesního také prokázala rozdíly v ultrastruktuře chloroplastů v závislosti na ozáření. Chloroplasty slunných listů měly stejnou plochu mediánního řezu, větší podíl plastoglobulů a větší plochu škrobového zrna na řezu, než chloroplasty stinných listů. Zároveň byl v chloroplastech slunných listů menší podíl granálních a stromálních tylakoidů, než v chloroplastech listů stinných (Vrbová et al., 2013). V případě tohoto výzkumu, kdy byl vliv ozáření kvantitativně hodnocen na úrovni obsahu škrobu v chloroplastech, se diference na slunné a stinné jehlice potvrdila. Ve slunných jehlicích bylo naměřeno větší množství škrobu, než v jehlicích stinných, což bylo pozorováno i na jiných jehličnanech při různé ozáření (Kierzkowski et al., 2007).

Možným problémem, který se může při využití různých komorových experimentálních systémů vyskytnout, je komorový efekt. V případě kultivace v uzavřených komorách mohou být stromy vystaveny například vyšší vlhkosti či teplotě, než jaká by byla přirozená při jejich růstu ve volném prostředí. Lhotáková et al. (2012) porovnávali výsledky ze stromů pěstovaných v těchto kultivačních sférách s výsledky ze stromů rostoucích na sousedních stanovištích pod širým nebem. Ve většině sledovaných parametrů se od sebe parametry jehlic z kontrolního stanoviště a komory s atmosférickou koncentrací CO<sub>2</sub> statisticky významně nelišily, vliv komorového efektu byl tedy zanedbatelný (Lhotáková et al., 2012).

Vývojově starší verzi železných kultivačních sfér jsou růstové komory s otevřenou střechou (open-top chambers, OTC). Mezi jejich slabé stránky však patří výrazné výkyvy v koncentraci CO<sub>2</sub>, teplotě, vlhkosti a rychlosti větru uvnitř komor (Wang et al., 1996). Vzhledem k tomu, že volně otevřená je pouze vrchní část komory, jsou podmínky uvnitř komory jiné, než v přirozeném okolním prostředí (Long et al., 2004). Postupným vývojem však došlo ke zlepšení a současné komory umožňují automatickou kontrolu většiny faktorů. Prostředí uvnitř komor se tak přiblížilo přirozeným vnějším podmínkám (Kellomaki et al., 2000).

Dalším výzkumným systémem je FACE (Free-Air Carbon Enrichment). Používá se nejen k výzkumu na stromech, ale i hospodářsky důležitých plodinách, či dokonce

bakteriích (Feng et al., 2009). Při jeho použití je možné rostliny pozorovat v přirozeném prostředí, jelikož sestává z dlouhých, do kruhu horizontálně či vertikálně postavených tubusů, které za pomoci trysek vypouští do prostředí CO<sub>2</sub> (Ainsworth a Long, 2005). Je tak možné ošetřovat velké množství rostlin, naopak aplikace pouze na menší vzorek stromů je nevhodná. Tímto způsobem se také daří eliminovat komorový efekt. Vzhledem k tomu, že CO<sub>2</sub> je v prostoru rozptylováno větrem, je jeho spotřeba vyšší, což znamená větší finanční náročnost této metody (Uprety et al., 2006). Navíc rozdíly v síle a směru větru mohou posílit nerovnoměrné rozptylování CO<sub>2</sub>, jehož koncentrace v porostu pak kolísá a nedosahuje tak vždy požadovaných hodnot (Selsted et al., 2011).

Existují další metody, jak na rostliny aplikovat CO<sub>2</sub>, z nich každá má své výhody a nevýhody. Jejich souhrn je uveden v práci Uprety et al. (2006).

### **5.1.2. Metody pro kvantifikaci škrobu na snímcích z elektronové mikroskopie**

Cílem výzkumu mé diplomové práce bylo kvantitativně stanovit vybrané parametry chloroplastů: velikost chloroplastu, velikost škrobového zrna a podíl škrobu na mediálním řezu chloroplastem při různé ozářenosti a koncentraci CO<sub>2</sub> v ovzduší. Množství asimilačního škrobu v chloroplastech vypovídá o rovnováze mezi fotosyntetickou produkcí a spotřebou asimilátů. Zároveň z toho však můžeme vyvodit, jaká je po škrobu v rostlině poptávka, čili jaká je síla sinků. Při zvýšené spotřebě energie, ale i intenzivním růstu a tvorbě nových struktur se v chloroplastech i přes intenzivní fotosyntézu nachází malé množství asimilačního škrobu, protože škrob je rozložen a transportován do místa spotřeby (Streit et al., 2013). Pokud je škrobu nadbytek, může se v chloroplastech ukládat až několik hodin, než dojde k jeho spotřebě v průběhu noci (Rasse a Tocquin, 2006; Crumpton-Taylor et al., 2012).

Kvantifikace škrobu se většinou provádí biochemicky za pomoci HPLC či kolorimetrie (Liu et al., 2005). Takovéto metody však stanoví obsah škrobu ve více jehlicích, které jsou před extrakcí škrobu homogenizovány. Z výsledků není tedy zřejmé, kde se škrob v jehlici nachází. Zjišťování obsahu škrobu ze snímků z TEM pomocí stereologických metod nám umožňuje škrob přímo lokalizovat a kvantifikovat

jeho obsah. Můžeme tak přesně určit, ve kterých částech mezofylu se škrob nacházel, a je také možné zjistit heterogenitu v jeho uložení v chloroplastech v rámci jehlice.

Aby byla zajištěna nevychýlenost odhadu plochy chloroplastu a plochy škrobových zrn, byly vybrány chloroplasty z mezofylové vrstvy příčného řezu jehlicí, které byly mediánně říznuté. To, že jde o mediánní řez, bylo znatelné z orientace tylakoidů v granech i tylakoidů stromálních. Tylakoidní membrány jsou na mediánním řezu rovnoběžné s buněčnou stěnou, která na chloroplast přiléhá. Prostudované práce, které řeší podobnou problematiku, často místo řezu chloroplastem neudávají (Pritchard et al., 1997).

Na vyhodnocení kvantitativních parametrů chloroplastů byly použity dvě metody. První metoda, stereologická metoda bodové mřížky, byla použita týmem Kutík et al. (1995) při kvantifikaci vlivu CO<sub>2</sub> na řepu červenou (*Beta vulgaris* L.) při různé dostupnosti dusíku. Kutík et al. (1995) měřili velikost chloroplastů a poměrné zastoupení jednotlivých struktur chloroplastu na mediánním řezu chloroplastem. Fólie s testovacím systémem (bodovou mřížkou) přikládali na snímky z TEM (Kutík et al., 1995). Manuální měření tohoto typu bez použití počítače se speciálním softwarem je velmi časově náročné a pracné.

Využití analýzy obrazu uvádějí Pritchard et al. (1997), kteří použili systém Optimas (Bioscan Inc., Edmonds, Washington). I když to není přímo uvedeno, lze se domnívat, že struktury byly obkreslovány (Pritchard et al., 1997). Další metodu, analýzu velikosti částic - PSA (particle size analysis), využili Cabálková et al. (2008). Škrobová zrna byla z chloroplastů izolována a poté nasnímána na TEM a vyhodnocena počítačovým softwarem, který spočítal jejich objem (Cabálková et al., 2008). Neudávají tedy plochu řezu, ale objem celých škrobových zrn, lze tedy porovnávat pouze trendy jejich výsledků s výsledky této diplomové práce, nikoliv konkrétní hodnoty.

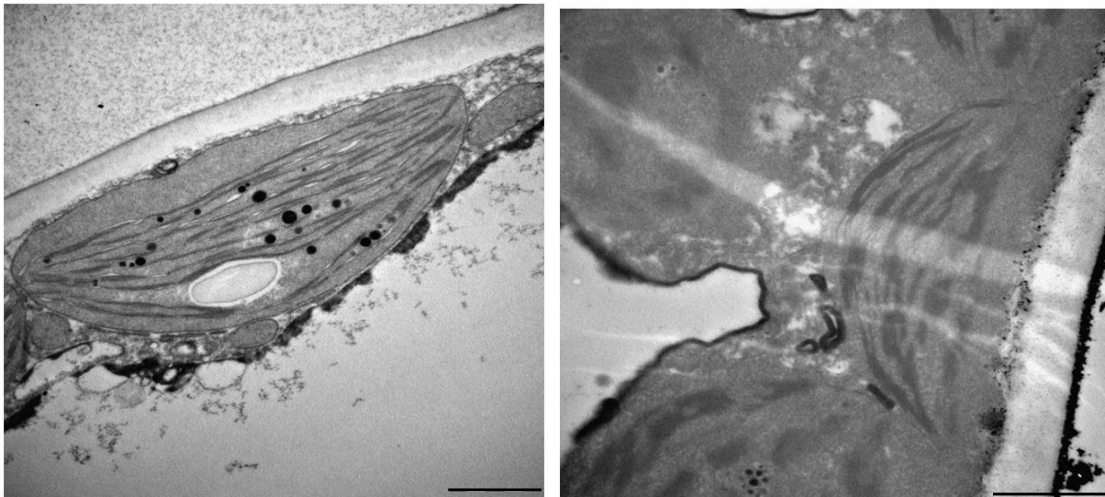
Existují různé metody, které je možné využít na kvantitativní vyhodnocení vzorků z elektronového mikroskopu, přičemž každá má svá specifika a je výhodná na určitý typ vzorku. Při volbě vhodné metody pro analýzu vzorků z TEM záleží mimo jiné na charakteru měřené struktury. V případě, že struktury nejsou dostatečně kontrastní a jednoduše odlišitelné od pozadí, nelze využít automatické prahování. Pokud nejsou struktury dostatečně kompaktní, metoda interaktivní segmentace je časově náročná. Chloroplasty i škrobová zrna byly na snímcích z TEM jednoduchých tvarů s většinou

jasnými obrysy. Obkreslit jejich strukturu v programu Ellipse 2.08 (ViDiTo, Košice, Slovensko) se tedy ukázalo jako časově úspornější, ale také přesnější alternativa. Při využití stereologické metody bodové mřížky program počítal s plochou odpovídající jednomu bodu mřížky, zatímco ruční obkreslení udávalo velikost struktury s přesností na jednotlivé pixely. Jak je vidět z Grafů 4.1 a 4.2, výsledky z měření pomocí metody bodové mřížky a metody interaktivní segmentace se statisticky neliší. To, že byla při výzkumu této diplomové práce ve výsledku použita metoda interaktivní segmentace, bylo dáno charakterem měřených struktur, srovnatelnou přesností a časovou úsporností této metody oproti stereologické metodě bodové mřížky.

## **5.2. Reprezentativnost první vrstvy mezofylu z hlediska kvantifikace škrobu**

Aby bylo možné analyzovat snímky z TEM, musí být pozorované struktury dostatečně kontrastní. Kontrast snímků určuje charakter pozorované struktury, jako například jejich tloušťka, hustota či chemická povaha, ale také typ kontrastního činidla. Vzhledem k tomu, že kontrastní činidlo, v tomto případě  $\text{OsO}_4$ , proniká do jehlice z povrchu a od řezné plochy segmentu, snižuje se jeho koncentrace v hlubších vrstvách bločku a v následných řezech i směrem ke střednímu válci, což se odráží v kvalitě obrazu (Obr. 5.1). Pokud by se první vrstva mezofylu pod pokožkou z hlediska kvantifikace ultrastruktury ukázala reprezentativní pro celou plochu mezofylu, bylo by hodnocení struktury buněk i ultrastruktury organel jednodušší, protože buňky jsou v této vrstvě zpravidla lépe zachovány. V případě této práce se reprezentativnost první vrstvy mezofylu potvrdila při měření plochy chloroplastů, ovšem při měření plochy škrobového zrna a podílu škrobu se slunné jehlice stromů rostoucích při atmosférické koncentraci  $\text{CO}_2$  signifikantně lišily od ostatních variant ozáření a koncentrace  $\text{CO}_2$  (Graf 4.3, 4.4, 4.5). Za těchto podmínek obsahovaly chloroplasty vybrané z celé plochy mezofylu více škrobu, než chloroplasty z první vrstvy. Vzhledem k tomu, že při výběru z první vrstvy mezofylu pod pokožkou jsou chloroplasty vybírány z celého jejího obvodu, jsou rovnoměrně započítány chloroplasty ze strany jehlice přivrácené i odvrácené dopadajícím záření, což může obsah škrobu v chloroplastech dále ovlivnit.

V nastudované literatuře byla ultrastruktura chloroplastů na základě jejich polohy v mezofylu popisována ve článku Kivimäenpää a Sutinen (2007), kteří došli k podobným závěrům, jako já. V jehlicích borovice lesní byly chloroplasty a škrobová zrna menší v buňkách mezofylu blíže epidermis, než v těch blíže endodermis (Kivimäenpää a Sutinen, 2007). Z těchto výzkumů je zřejmé, že velikost a ultrastruktura chloroplastů tvoří v rámci vrstev mezofylu určité gradienty. Moje hypotéza pro zdůvodnění těchto gradientů se zakládá na pozici asimilátů vůči sinkům. Chloroplasty, které jsou blíže vodivým pletivům, obsahují více škrobu patrně proto, aby byl urychlen transport oligosacharidů po jeho rozložení. V době růstu jehlice může škrob uložený v blízkosti bazálních meristémů sloužit také jako energie pro tvorbu nových buněk a pletiv, je tedy výhodnější, aby byl blíže těmto sinkům.



Obr. 5.1 Porovnání mikrofotografie chloroplastu snímaného z první vrstvy mezofylu pod pokožkou (snímek vlevo) a z vrstvy mezofylu blíže střednímu válci (snímek vpravo). Měřítka v pravém dolním rohu udává velikost 1  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. Vliv ozáření na velikost chloroplastů a obsah asimilačního škrobu

Důležitým vnějším faktorem, který ovlivňuje stavbu jehlice i strukturu buněk, je ozáření. V případě mé práce byl vliv ozáření zkoumán vyhodnocováním ultrastruktury jehlic odebíraných ze slunné a stinné části koruny stromu. Radochová et al. (2013) pozorovali variabilitu v ultrastruktuře chloroplastů v první vrstvě mezofylu

slunných jehlic z hlediska toho, zda byly v části přivrácené nebo odvrácené slunečnímu záření. Chloroplasty z části jehlice, která byla vystavena přímému slunečnímu záření, měly vyšší poměrné zastoupení plastoglobulů a nižší poměrné zastoupení granálních a stromálních tylakoidů, než chloroplasty z části jehlice, která byla zastíněná (Radochová et al., 2013). Heterogenita ultrastruktury v rámci jedné jehlice z hlediska směru ozáření nebyla v mém výzkumu vyhodnocena.

Lhotáková et al. (2012) vyhodnocovali vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a ozářenosti na stavbu jehlice. V tomto případě se koncentrace CO<sub>2</sub> neodrazila na objemu jehlice, ani na procentuálním zastoupení jednotlivých pletiv na řezu jehlice. Naopak ozářenost měla na tyto parametry signifikantní vliv, byla tedy označena za silnější vnější faktor, než koncentrace CO<sub>2</sub> (Lhotáková et al., 2012). Z výsledků této diplomové práce je znatelné, že ozářenost měla i v tomto případě na velikost chloroplastů a škrobových zrn výraznější vliv, než druhý sledovaný vnější faktor, kterým byla koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší (Tabulka 4.1). Ačkoliv na velikost chloroplastu měla ozářenost signifikantní vliv pouze při atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub>, plochu škrobových zrn a podíl škrobu ovlivňovala velice výrazně ve všech zkoumaných kombinacích. Ve slunných jehlicích bylo vyšší procentuální zastoupení škrobu, než v jehlicích stinných. To odpovídá hypotéze, že při vyšší ozářenosti nedochází k limitaci ozářeností a potenciál akumulace škrobu je vyšší (Niinemets, 1997). K podobným výsledkům došli i Keirzkowski et al. (2007). Chloroplasty z nezastíněných jehlic jedle bělokoré měly větší obsah asimilačního škrobu, samotné chloroplasty však byly také větší na řezu (Kierzkowski et al., 2007). Takovými výsledkům však odporuje pozdější studie prováděná na stromech jalovce *Juniperus saltuaria* a jedle *Abies georgei*. V tomto případě se v jehlicích odebíraných z různých pater koruny těchto stromů nenacházely výrazné rozdíly v obsahu škrobu (Li et al., 2009). Nebyla zde však měřena fotosyntetická produkce, nelze tedy stanovit, že ve všech jehlicích docházelo ke stejné míře asimilace. Sacharidy mohly být okamžitě využity na metabolické či růstové procesy jehlice, a pouze část z nich zůstala uložena v chloroplastech ve formě škrobu. Další hypotézou, která vysvětluje malé rozdíly v obsahu škrobu, je možný okamžitý přesun sacharidů do nižších, méně ozářených částí koruny, aniž by se asimiláty uložily ve formě škrobu (Li et al., 2009).

Ozářenost měla vliv i na procentuální zastoupení chloroplastů se škrobovými zrny. Většina chloroplastů ze stinných jehlic neobsahovala žádný škrob, slunné jehlice



obsahovaly více chloroplastů se škrobovými zrny (Grafy 4.5 - 4.8). To, že chloroplasty stinných jehlic neobsahovaly tolik škrobu, by mohlo potvrzovat hypotézu uvedenou ve studii Li et al. (2009). Sacharidy, které se do těchto chloroplastů transportují, mohou být využity k okamžité spotřebě a neukládají se tak ve formě škrobu.

Počet škrobových zrn v chloroplastech, které obsahovaly škrob, se v závislosti na ozáření či koncentraci CO<sub>2</sub> neměnil. Většina těchto chloroplastů obsahovala 1 škrobové zrno, v některých případech byla pozorována 2 až 3 zrna. Tento počet však neudává celkový počet všech škrobových zrn v chloroplastu, ale pouze ty, které ležely v místě, kterým procházel mediánní řez. Na udání nevychýleného odhadu počtu škrobových zrn by bylo potřeba použít sériové řezy v kombinaci se stereologickou metodou disektoru (Kubínová et al., 2014).

V literatuře se objevuje jen malé množství výzkumů zabývajících se pouze vlivem ozáření na velikost a ultrastrukturu chloroplastů, daleko lépe jsou přitom popsány fyziologické procesy buněk při nadměrné ozáření. Patří mezi ně například xantofylový cyklus, deaktivace na světlo citlivých proteinů D1 a D2, či proces migrace světlosběrných antén mezi fotosystémy, který napomáhá rovnoměrnému rozdělení absorpce slunečního záření mezi PSI a PSII (Kurasová et al., 2003; Mullineaux a Emlin-Jones, 2005; Štroch et al., 2008).

Dalším diskutovaným tématem je tzv. polední deprese asimilace. Tento proces nastává v poledne, kdy fotosyntetická aktivita rostliny klesá z důvodu uzavírání průduchů, jakožto ochrany proti ztrátám vody při intenzivním přímém ozáření (Guo et al., 2009). Odběr vzorků pro tuto práci probíhal v odpoledních hodinách, kdy se rychlost fotosyntézy po případné polední depresi asimilace zase zpravidla zvyšuje, proto by naměřené výsledky neměly být tímto stavem ovlivněny. Dalším důležitým faktorem pro vliv ozáření je dostupnost vody. Při jejím nedostatku dochází k degradaci škrobu a následné syntéze sacharózy, ta poté slouží jako osmoticky aktivní látka (Fox a Geiger, 1986), která napomáhá udržovat vodu v buňkách. V průběhu trvání experimentu však byla dostupnost vody a množství srážek standardní, proto by ani tento fakt neměl mít na výsledky vliv.

## 5.4. Vliv koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší na velikost chloroplastů a obsah asimilačního škrobu

Dalším vnějším faktorem, působícím na rostliny, je koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře. Ta ovlivňuje jak vnější (Pokorný et al., 2011), tak vnitřní stavbu jehlice (Lhotáková et al., 2012) i množství asimilačního škrobu v chloroplastech (Pritchard et al., 1997; Liu et al., 2005). Škrob je poté použit buď přímo v chloroplastech, nebo po rozkladu na transportní oligosacharidy putuje do sinků, kde je spotřebován či dlouhodobě uložen.

Jednou z nejběžnějších reakcí rostlin na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> je navýšení obsahu nestrukturních sacharidů v asimilačních orgánech (Saxe et al., 1998). Děje se tak pravděpodobně z toho důvodu, že kapacita enzymu Rubisco není při současné koncentraci CO<sub>2</sub> v ovzduší dostatečně saturovaná. Zvýšený obsah CO<sub>2</sub> v ovzduší tedy rostlina dokáže efektivně využívat a dochází ke zvýšené produkci asimilátů (Drake et al., 1997). Ty se pak v případě nedostatečné síly sinků ukládají ve formě škrobu. Mezi další vysvětlení zvýšeného obsahu asimilačního škrobu v chloroplastech patří snížená míra fotorespirace. V podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> dochází k oxygenaci ribulosa-1,5-bisfosfátu v menší míře, naopak jeho karboxylační aktivita se navýší (Drake et al., 1997). V případě, že rostlina aktuálně nespotřebuje veškeré asimiláty, ukládají se tyto v chloroplastech ve formě škrobových zm.

Při výzkumu této diplomové práce se vliv koncentrace CO<sub>2</sub> signifikantně projevil na množství asimilačního škrobu v chloroplastech, menší vliv měl však na velikost chloroplastů. Při zvýšené koncentraci obsahovaly chloroplasty slunných jehlic několikanásobně více škrobu, než u stinných jehlic, a zároveň mnohem více škrobu, než ve slunných i stinných jehlicích rostoucích při běžné koncentraci CO<sub>2</sub>. Tento trend byl také pozorován při výzkumech na borovici bahenní či smrku ztepilém, kdy při ošetření zvýšeným CO<sub>2</sub> obsahovaly jehlice více škrobu (Pritchard et al., 1997; Cabálková et al., 2008).

Také Dalen et al. (2001), kteří vyhodnocovali obsah škrobu v jehlicích smrku ztepilého pomocí HPLC, stejně tak jako Dawes et al. (2013), kteří vyhodnocovali chemické složení jehlic borovice pyrenejské (*Pinus mugo* ssp. *Uncinata* Ramond) a modřínu opadavého (*Larix decidua* L.), pozorovali nárůst v obsahu škrobu v jehlicích při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (Dalen et al., 2001; Dawes et al., 2013).

Na velikost chloroplastů neměla koncentrace CO<sub>2</sub> signifikantní vliv. Stejně tak jako u ozáření, i v tomto případě se tento fakt neshoduje s některými publikacemi. Pritchard et al. (1997) při výzkumu na borovici bahenní popsali větší plochu chloroplastů při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. Studií na toto téma prováděných na stromech není mnoho, výzkumy na tabáku planém se však shodují v nárůstu obsahu škrobu i velikosti chloroplastů při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (Wang et al., 2004). V mém případě velikost chloroplastů nebyla ovlivněna, a to i přes rozdíl v obsahu škrobu. Domnívám se, že příčinou nezměněné velikosti chloroplastů by mohly být u variant, které neobsahovaly škrob, změny v poměrném zastoupení jiných parametrů chloroplastu, například systému tylakoidů. Změření těchto parametrů však přesahuje rámec méj diplomové práce.

Stejně jako ozáření ovlivnila koncentrace CO<sub>2</sub> počet chloroplastů obsahujících škrob. Při zvýšené ozáření i koncentraci CO<sub>2</sub> se škrob nacházel téměř ve všech pozorovaných chloroplastech (Graf 4.7). Ukazuje se také, že je důležitá interakce těchto dvou faktorů, která má na velikost chloroplastů i škrobových zrn značný vliv (Tabulka 4.1).

Holá et al. (rukopis v přípravě) popisují kvantitativní vyhodnocení ultrastruktury chloroplastů pod vlivem CO<sub>2</sub> a ozáření. Pracovali s jehlicemi smrku ztepilého odebranými ve stejném období jako vzorky pro tuto práci. S využitím stereologických metod vyhodnotili změny nejen ve velikosti chloroplastů a zastoupení škrobu, ale i další parametry, tj. zastoupení tylakoidů, stromatu a plastoglobulů. Koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší se ukázala jako faktor, který signifikantně ovlivňoval ultrastrukturu chloroplastů, ozáření se však ukázala jako faktor výrazně silnější (Holá et al.; rukopis v přípravě).

Vzorky jehlic pro výzkum této diplomové práce byly odebírány v říjnu. To je období, kdy množství asimilačního škrobu v chloroplastech klesá z důvodu snížení rychlosti čisté fotosyntézy, či nástupu mrazovému otužování. V období zimy se škrob v chloroplastech prakticky nevyskytuje (Senser et al., 1975).

Začátek podzimu je doba, kdy u většiny stálezelených jehličnanů temperátních a boreálních ekosystémů začíná probíhat proces mrazového otužování. Ten spočívá v rozložení naasimilovaného škrobu na monosacharidy, které fungují jako osmoprotektanty a rostlina díky nim získá odolnost proti mrazu (Kitao et al., 2004). Tento jev byl pozorován např. v jehlicích borovice bahenní, které na podzim

obsahovaly méně škrobu, než na jaře, a projevil se jak u jedinců rostoucích za běžných podmínek, tak u těch rostoucích při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (Pritchard et al., 1997). Práce Cabálková et al. (2008) na smrku ztepilém však ukázala, že jehlice ošetřené zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> obsahovaly ještě v říjnu velké množství škrobu, oproti jehlicím rostoucím při běžné koncentraci CO<sub>2</sub>. Na základě těchto výsledků autoři předpokládají, že zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> oddaluje proces mrazového otužování, množství škrobu se tak v chloroplastech začne snižovat až později na podzim (Cabálková et al., 2008). K této hypotéze se přikláním, jelikož podporuje výsledky získané při mém výzkumu, kdy se v jehlicích odebíraných v říjnu při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> objevovalo výrazněji více škrobu, než v jehlicích neošetřených, ve kterých již pravděpodobně probíhal proces mrazového otužování. Domnívám se, že se zpoždění mrazového otužování nemusí na rostlině negativně projevit ve chvíli, kdy zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> doprovází i zvýšená teplota. V takové situaci může dojít ke zpoždění nástupu období mrazu na dobu, kdy má strom již jen minimální množství škrobu. Pokud však k takovému posunu vegetační sezóny nedojde, může přítomnost škrobu v chloroplastech způsobit rostlině značné problémy.

Kolegyně Bc. Radka Bardoňová vyhodnocovala pro svou diplomovou práci obsah škrobu v chloroplastech jehlic stejných stromů, jako já. Využívala k tomu ovšem biochemické metody HPLC. Výsledky R. Bardoňové se neshodují s mými výsledky. V jejím případě obsahovaly nejvíce škrobu chloroplasty stinných jehlic ošetřených zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>, nejméně škrobu poté obsahovaly slunné jehlice bez ošetření CO<sub>2</sub>. Mezi těmito dvěma kombinacemi byl průkazný statisticky významný rozdíl. O něco méně škrobu, než chloroplasty stinných jehlic ošetřených CO<sub>2</sub>, obsahovaly slunné jehlice rostoucí při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>, srovnatelný obsah škrobu byl i ve stinných jehlicích bez ošetření, výsledky těchto kombinací faktorů se však signifikantně nelišily od sebe navzájem, ani od předchozích dvou variant. Je tedy znatelné, že efekt ozářenosti se na obsahu škrobu v chloroplastech neprojevil tak výrazně, jako v případě mého měření, kdy se od sebe slunné a stinné jehlice výrazně lišily.

Rozdíly ve výsledcích mých a výsledcích R. Bardoňové mohou mít více vysvětlení. V případě mého měření za využití stereologických metod byla vždy měřena pouze 1 jehlice z každého stromu, při biochemickém měření se však využívá větší množství jehlic z každého stromu, konkrétně 6 paralelních vzorků z jedné situace (kombinace CO<sub>2</sub> a ozářenost), v každém takovém vzorku bylo aspoň 10 jehlic. Mnou

měřené chloroplasty byly vybírány pouze z mezofylu, v případě výzkumu R. Bardoňové byl však vyhodnocen obsah škrobu v celých jehlicích, které byly před měřením homogenizovány. Jehlice byly odebírány v říjnu, což je období, kdy u smrku v horských oblastech již může probíhat mrazové otužování. Odběr materiálu pro mou práci proběhl na začátku října, kdy denní ani noční teploty neklesaly pod 10°C (meteorologická data ze stanice Bílý Kříž poskytl Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i.). Teplota potřebná k nastartování procesu otužování se odvíjí od druhu i teploty, které je strom dlouhodobě vystaven (Greer et al., 2000), je tedy možné, že za těchto podmínek již mohlo k rozkladu škrobu z důvodu otužování docházet. V případě mých výsledků vypovídá poměrně vysoký poměr škrobu v chloroplastech o tom, že se proces otužování patrně zpožďuje u stromů rostoucích ve zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. Jelikož jde však o přechodové období, mohou se jednotlivé jehlice a chloroplasty nacházet v různé fázi tohoto procesu. Výsledky měření pouze několika jehlic tak nemusí vypovídat o celkovém stavu stromu. V případě R. Bardoňové vychází výsledky z většího počtu jehlic a opakování, což může být důvodem pozorovaných rozdílů. Pro ověření vlivu ozáření a koncentrace CO<sub>2</sub> na obsah škrobu v chloroplastech by bylo vhodné porovnávat výsledky z letních i podzimních odběrů. Z časových důvodů však nebylo možné kvantitativně vyhodnotit i letní odběr z července 2011. Mašková et al. (rukopis v přípravě) vyhodnocovali jehlice ze stejně ošetřených smrků z experimentální stanice Bílý Kříž, které byly odebírány v srpnu 2009. Obsah škrobu byl vyhodnocován jak biochemicky za použití HPLC, tak stereologicky z TEM. Biochemické měření prokázalo nárůst v obsahu škrobu při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> v jehlicích 1. i 2. ročníku. Při stereologickém vyhodnocování ultrastruktury chloroplastů však jehlice nevykazovaly tak výrazný rozdíl v poměrném zastoupení škrobu. Jehlice prvního ročníku rostoucí při atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub> obsahovaly o něco méně škrobu, než jehlice rostoucí při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>, v případě jehlic druhého ročníku to však bylo naopak. Vliv ozáření nebyl vyhodnocován, jelikož byly odebírány pouze slunné jehlice (Mašková et al., rukopis v přípravě). V případě výsledků R. Bardoňové z letních odběrů (červenec), se obsah škrobu ve slunných jehlicích také signifikantně nelišil v závislosti na koncentraci CO<sub>2</sub>. Podobný rozpor ve stanovení obsahu škrobu v jehlicích při využití různých metodik pozorovali Sallas et al. (2003). Při biochemickém vyhodnocení obsahu škrobu v jehlicích smrku ztepilého nepozorovali výrazný rozdíl mezi jehlicemi vystavenými zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> a jehlicemi kontrolními. Při

měření velikosti škrobových zrn se však ukázalo, že je jich signifikantně více v jehlicích ošetřených CO<sub>2</sub> (Sallas et al., 2003).

## 5.5. Význam studia vlivu CO<sub>2</sub> na dřeviny

Tato diplomová práce je součástí grantového projektu GAČR P501/10/0340 s názvem „Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a ozáření na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních“ řešeném v letech 2010-2014 v řešitelském konsorciu vedeném prof. RNDr. Janou Albrechtovou, Ph.D.. Na tomto tématu pracovalo několik výzkumných skupin a experimenty probíhaly jak na smrku ztepilém, tak na buku lesním. Vzhledem k tomu, že studuji na Katedře didaktiky a zaměření mého studia je Učitelství biologie pro střední školy, byly mé časové možnosti pro výzkum menší, než pro studenty na Katedře experimentální biologie rostlin, na níž jsem diplomovou práci vypracovala. Soustředila jsem se tedy pouze na výzkum a kvantifikaci škrobu v chloroplastech jehlic rostoucích při různé ozáření a různé koncentraci CO<sub>2</sub>. Jehlice byly odebrány z 10 stromů smrku ztepilého v jednom roce v jednom sezónním období. Má práce tak doplní výsledky kolegů, kteří pracovali s větším objemem dat či používali jiné metody vyhodnocování obsahu škrobu v chloroplastech. Zároveň také přinese užitečné poznatky z hlediska metodiky vyhodnocování obsahu škrobu v chloroplastech. Pro udání obecnějších závěrů a pro přesnější reakce na hypotézy bude vhodné vycházet z většího počtu vzorků či opakování. Právě opakování měření v různých letech i různých fázích sezónního období poskytne komplexní náhled na reakci stromu na ozáření a koncentraci CO<sub>2</sub>. Pomůže také eliminovat odchylky v datech způsobené nestandardními výkyvy počasí (např. delší období sucha, extrémní mrazy, atd.). Dalším faktorem, na který by měl být brán zřetel, je stáří zkoumaných jedinců. Pro můj výzkum byly použity juvenilní, 11 let staré stromy. Velké množství výzkumů probíhá právě na juvenilních stromech, či na semenáčcích. Je však zřejmé, že dospělé stromy mohou reagovat na vybrané faktory rozdílně. Experimenty na dospělých stromech jsou ovšem velice časově i finančně náročné.

Studie na podobná témata jsou v dnešní době, kdy pozorujeme klimatické změny, nezbytné. Lesy představují nejdůležitější biom z hlediska ukládání uhlíku do

biomasy, jsou však stále častěji vystavovány intenzivním stresovým faktorům. Jedním z nich je i zvyšující se extremita počasí. I přesto, že se celkový roční úhrn srážek v posledních dekáдах výrazně neliší, kvůli nerovnoměrnému rozložení srážek během roku častěji dochází k delším obdobím sucha. Taková situace nastala např. i v roce 2015, kdy bylo během srpna a září extrémní sucho, které v některých oblastech, jako například v Beskydech, přetrvalo až do podzimu (CzechGlobe, Intenzita sucha; <http://www.intersucho.cz/cz/mapy/intenzita-sucha/>). Nepříznivé podmínky počasí mohou strom oslabit, ten se pak stává náchylným k dalším stresovým faktorům. V případě smrku ztepilého mají delší období sucha za následek sníženou odolnost stromu proti napadení lýkožroutem smrkovým, který představuje neustálou hrozbu pro naše lesy (Albrechtová, J., osobní konzultace).

Vzhledem k tomu, že zvyšování koncentrace CO<sub>2</sub> v ovzduší je v dnešní době stále více a více diskutované téma, doufám, že i má práce pomůže odhalit, jakým způsobem na takovéto změny reaguje smrk ztepilý, a při zahrnutí těchto výsledků do širšího kontextu poté nastínit, jakým způsobem se bude vyvíjet lesní ekosystém temperátních i boreálních lesů.

## 6. Závěr

Obsahem této závěrečné kapitoly bude vyhodnocení splnění stanovených cílů, srovnání výsledků s hypotézami, a zasazení výsledků této práce do širšího kontextu.

Cíl 1) *Určit, zda první vrstva mezofylu pod pokožkou je pro kvantifikaci škrobu reprezentativní pro celou jehlici; a Hypotéza 1) První vrstva mezofylu je reprezentativní pro celou jehlici z hlediska kvantifikace škrobu v chloroplastech*

Výsledky z měření poměrného zastoupení škrobu v chloroplastech z první vrstvy mezofylu pod pokožkou a celé plochy mezofylu byly téměř shodné. Přesto jsem v případě vyhodnocení obsahu škrobu v ozářených jehlicích rostoucích při atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub> zjistila signifikantní rozdíl mezi výsledky z první vrstvy mezofylu pod pokožkou a z celé plochy mezofylu. Chloroplasty z první vrstvy obsahovaly méně škrobu, než chloroplasty vybírané z celé plochy. Tento rozdíl nebyl znatelný na ploše chloroplastu, pouze na ploše škrobového zrna a tím pádem i na poměrném zastoupení škrobu v chloroplastu.

Cíl 1) lze tedy považovat za úspěšně splněný, Hypotéza 1) se však ukázala jako platná pouze v případě stanovení plochy chloroplastu. V případě stanovení plochy škrobového zrna a poměrného zastoupení škrobu v chloroplastech nelze tuto hypotézu jednoznačně podpořit. Její platnost se však prokázala ve 3 ze 4 kombinací vnějších faktorů. Předpokládám, že při větším počtu vzorků či opakování by bylo možné vyhodnotit reprezentativnost chloroplastů z první vrstvy mezofylu s větší jistotou. Případně bych doporučila reprezentativnost chloroplastů z první vrstvy mezofylu ověřovat dříve ve vegetační sezóně. Absence škrobových zrn v relativně velkém podílu měřených chloroplastů daná pravděpodobně koncem vegetační sezony vnášely do dat vyšší variabilitu. Kvantitativní vyhodnocení dalšího odběru však přesahovalo rámeček této diplomové práce.

Cíl 2) *Vyhodnotit vliv ozářenosti a zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na poměrné zastoupení škrobu na mediánním řezu chloroplastů v mezofylu jehlice smrku ztepilého; Hypotéza 2) V jehlicích stromů rostoucích při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> je obsah škrobu vyšší, než při běžné koncentraci CO<sub>2</sub> v ovzduší; a Hypotéza 3) Ve slunných jehlicích je na mediánním řezu chloroplastem vyšší poměrné zastoupení škrobu, než ve stinných*



Ze dvou studovaných faktorů měla jednoznačně silnější vliv ozáření. Chloroplasty slunných jehlic obsahovaly více škrobu, signifikantní rozdíl však byl pozorován pouze při společném působení ozáření a CO<sub>2</sub>. Velikost samotných chloroplastů nebyla ozáření výrazně ovlivněna.

Vliv koncentrace CO<sub>2</sub> měl na obsah škrobu v chloroplastech také signifikantní vliv, kdy ošetřené chloroplasty obsahovaly škrobu více. Rozdíl však byl znatelnější, jak již bylo zmíněno, při kombinaci s vyšší ozáření. V takovém případě obsahovaly chloroplasty až pětinasobně více škrobu, než při působení pouze zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>. Na plochu chloroplastu opět nemělo zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> znatelný vliv.

Cíl 2) tedy považuji za splněný, Hypotézy 2) a 3) za platné.

I přesto, že k vyslovení obecnějších závěrů by bylo potřeba větší množství opakování a vyhodnocení většího množství vzorků, doufám, že tato práce přispěje k prohloubení znalostí o odezvě lesů k probíhající klimatické změně. Tyto znalosti nám pak pomohou odhadnout, jaká bude v koloběhu uhlíku úloha lesů v budoucnosti, zda bude les sinkem, či se stane zdrojem uhlíku v atmosféře.

## 7. Literatura

- Ainsworth, E.A., and Long, S.P.** (2005). What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy. *New Phytologist* **165**, 351-371.
- Albrechtová, J., Janáček, J., Lhotáková, Z., Radochová, B., and Kubínová, L.** (2007). Novel efficient methods for measuring mesophyll anatomical characteristics from fresh thick sections using stereology and confocal microscopy: application on acid rain-treated Norway spruce needles. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1451-1461.
- Anttonen, S., Sutinen, M.L., and Heagle, A.S.** (1996). Ultrastructure and some plasma membrane characteristics of ozone-exposed loblolly pine needles. *Physiologia Plantarum* **98**, 309-319.
- Back, J., and Huttunen, S.** (1992). Structural responses of needles of conifer seedlings to acid-rain treatment. *New Phytologist* **120**, 77-88.
- Ballottari, M., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., and Bassi, R.** (2007). Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 8947-8958.
- Barber, J., and Andersson, B.** (1992). Too much of a good thing - light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 61-66.
- Barnaby, J.Y., Fleisher, D., Reddy, V., and Sicher, R.** (2015). Combined effects of CO<sub>2</sub> enrichment, diurnal light levels and water stress on foliar metabolites of potato plants grown in naturally sunlit controlled environment chambers. *Physiologia Plantarum* **153**, 243-252.
- Bertrand, A., and Bigras, F.J.** (2006). Atmospheric carbon dioxide enrichment reduces carbohydrate and nitrogen reserves in overwintering *Picea mariana*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **21**, 3-13.
- Bonan, G.B.** (2008). Forests and climate change: Forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science* **320**, 1444-1449.
- Bondada, B.R., and Syvertsen, J.P.** (2003). Leaf chlorophyll, net gas exchange and chloroplast ultrastructure in citrus leaves of different nitrogen status. *Tree Physiology* **23**, 553-559.
- Brehelin, C., Kessler, F., and van Wijk, K.J.** (2007). Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science* **12**, 260-266.
- Cabálková, J., Wahlund, K.-G., and Chmelík, J.** (2007). Complex analytical approach to characterization of the influence of carbon dioxide concentration on carbohydrate composition in Norway spruce needles. *Journal of Chromatography A* **1148**, 189-199.
- Cabálková, J., Příbyl, J., Skládal, P., Kulich, P., and Chmelík, 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 CO<sub>2</sub> concentration. *Tree Physiology* **28**, 1593-1599.
- Campbell, P.K.E., Rock, B.N., Martin, M.E., Neefus, C.D., Irons, J.R., Middleton, E.M., and Albrechtová, J.** (2004). Detection of initial damage in Norway spruce canopies using hyperspectral airborne data. *International Journal of Remote Sensing* **25**, 5557-5583.
- Crumpton-Taylor, M., Grandison, S., Png, K.M.Y., Bushby, A.J., and Smith, A.M.** (2012). Control of Starch Granule Numbers in *Arabidopsis* Chloroplasts. *Plant Physiology* **158**, 905-916.

- Dalen, L.S., Johnsen, O., and Ogner, G.** (2001). CO<sub>2</sub> enrichment and development of freezing tolerance in Norway spruce. *Physiologia Plantarum* **113**, 533-540.
- Daum, B., and Kuehlbrandt, W.** (2011). Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2393-2402.
- Dawes, M.A., Hagedorn, F., Handa, I.T., Streit, K., Ekblad, A., Rixen, C., Koerner, C., and Haettenschwiler, S.** (2013). An alpine treeline in a carbon dioxide-rich world: synthesis of a nine-year free-air carbon dioxide enrichment study. *Oecologia* **171**, 623-637.
- Demmig-Adams, B., Muller, O., Stewart, J.J., Cohu, C.M., and Adams, W.W., III.** (2015). Chloroplast thylakoid structure in evergreen leaves employing strong thermal energy dissipation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **152**, 357-366.
- Drake, B.G., Gonzalez-Meler, M.A., and Long, S.P.** (1997). More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub>? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 609-639.
- Egger, B., Einig, W., Schlereth, A., Wallenda, T., Magel, E., Loewe, A., and Hampp, R.** (1996). Carbohydrate metabolism in one- and two-year-old spruce needles, and stem carbohydrates from three months before until three months after bud break. *Physiologia Plantarum* **96**, 91-100.
- Eguchi, N., Fukatsu, E., Funada, R., Tobita, H., Kitao, M., Maruyama, Y., and Koike, T.** (2004). Changes in morphology, anatomy, and photosynthetic capacity of needles of Japanese larch (*Larix kaempferi*) seedlings grown in high CO<sub>2</sub> concentrations. *Photosynthetica* **42**, 173-178.
- Evans, J.R.** (1999). Leaf anatomy enables more equal access to light and CO<sub>2</sub> between chloroplasts. *New Phytologist* **143**, 93-104.
- Evans, J.R., and Poorter, H.** (2001). Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell and Environment* **24**, 755-767.
- Evert, R., F.** (2006). *Esau's Plant Anatomy*. (USA: Wiley-Liss).
- Feng, Y., Lin, X., Wang, Y., Zhang, J., Mao, T., Yin, R., and Zhu, J.** (2009). Free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) enhances the biodiversity of purple phototrophic bacteria in flooded paddy soil. *Plant and Soil* **324**, 317-328.
- Fowler, D., Cape, J.N., Coyle, M., Flechard, C., Kuylenstierna, J., Hicks, K., Derwent, D., Johnson, C., and Stevenson, D.** (1999). The global exposure of forests to air pollutants. *Water Air and Soil Pollution* **116**, 5-32.
- Fox, T.C., and Geiger, D.R.** (1986). Osmotic response of sugar-beet source leaves at CO<sub>2</sub> compensation point. *Plant Physiology* **80**, 239-241.
- Greer, D.H., Robinson, L.A., Hall, A.J., Klages, K., and Donnison, H.** (2000). Frost hardening of *Pinus radiata* seedlings: effects of temperature on relative growth rate, carbon balance and carbohydrate concentration. *Tree Physiology* **20**, 107-114.
- Griffin, K.L., Anderson, O.R., Gastrich, M.D., Lewis, J.D., Lin, G.H., Schuster, W., Seemann, J.R., Tissue, D.T., Turnbull, M.H., and Whitehead, D.** (2001). Plant growth in elevated CO<sub>2</sub> alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2473-2478.
- Grill, D., Tausz, M., Pollinger, U., Jimenez, M.S., and Morales, D.** (2004). Effects of drought on needle anatomy of *Pinus canariensis*. *Flora* **199**, 85-89.
- Guo, W.-D., Guo, Y.-P., Liu, J.-R., and Mattson, N.** (2009). Midday depression of photosynthesis is related with carboxylation efficiency decrease and D1

- degradation in bayberry (*Myrica rubra*) plants. *Scientia Horticulturae* **123**, 188-196.
- Hjelm, U., and Ogren, E.** (2003). Is photosynthetic acclimation to low temperature controlled by capacities for storage and growth at low temperature? Results from comparative studies of grasses and trees. *Physiologia Plantarum* **119**, 113-120.
- Holaday, A.S., Martindale, W., Alred, R., Brooks, A.L., and Leegood, R.C.** (1992). Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low-temperature. *Plant Physiology* **98**, 1105-1114.
- Holá, D., Radochová, B., Lhotáková, Z., Kočová, M., Rothová, O., Šprtová, M., Kubásek, J., Janáček, J., Čapek, M., Holišová, P., Tůmová, L., Urban, O., Kubínová, L., and Albrechtová, J.** (In preparation). The different response of sun-exposed and shaded leaves of Norway spruce and European beech to elevated CO<sub>2</sub>: The analysis of the chloroplast ultrastructure and the primary photochemistry.
- Huang, L.F., Zheng, J.H., Zhang, Y.Y., Hu, W.H., Mao, W.H., Zhou, Y.H., and Yu, J.Q.** (2006). Diurnal variations in gas exchange, chlorophyll fluorescence quenching and light allocation in soybean leaves: The cause for midday depression in CO<sub>2</sub> assimilation. *Scientia Horticulturae* **110**, 214-218.
- IPCC.** (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* In *Mitigation of climate change*, R.K. Pachauri and L.A. Meyer, eds (Geneva, Switzerland), pp. 151.
- Kellomaki, S., Wang, K.Y., and Lemettinen, M.** (2000). Controlled environment chambers for investigating tree response to elevated CO<sub>2</sub> and temperature under boreal conditions. *Photosynthetica* **38**, 69-81.
- Kierzkowski, D., Samardakiewicz, S., and Robakowski, P.** (2007). Variation in ultrastructure of chloroplasts in needles of silver fir (*Abies alba* Mill.) saplings growing under the canopies of diverse tree species. *Polish Journal of Ecology* **55**, 821-825.
- Kitao, M., Qu, L., Koike, T., Tobita, H., and Maruyama, Y.** (2004). Increased susceptibility to photoinhibition in pre-existing needles experiencing low temperature at spring budbreak in Sakhalin spruce (*Picea glehnii*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **122**, 226-232.
- Kitao, M., Tobita, H., Utsugi, H., Komatsu, M., Kitaoka, S., Maruyama, Y., and Koike, T.** (2012). Photosynthetic traits around budbreak in pre-existing needles of Sakhalin spruce (*Picea glehnii*) seedlings grown under elevated CO<sub>2</sub> concentration assessed by chlorophyll fluorescence measurements. *Tree Physiology* **32**, 998-1007.
- Kivimäenpää, M., and Sutinen, S.** (2007). Microscopic structure of Scots pine (*Pinus sylvestris* (L.)) needles during ageing and autumnal senescence. *Trees-Structure and Function* **21**, 645-659.
- Kivimäenpää, M., Sutinen, S., Karlsson, P.E., and Selldén, G.** (2003). Cell structural changes in the needles of Norway spruce exposed to long-term ozone and drought. *Annals of Botany* **92**, 779-793.
- Kivimäenpää, M., Sutinen, S., Medin, E.L., Karlsson, P.E., and Selldén, G.** (2001). Diurnal changes in microscopic structures of mesophyll cells of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., and the effects of ozone and drought. *Annals of Botany* **88**, 119-130.

- Kivimäenpää, M., Jonsson, A.M., Stjernquist, I., Selldén, G., and Sutinen, S.** (2004). The use of light and electron microscopy to assess the impact of ozone on Norway spruce needles. *Environmental Pollution* **127**, 441-453.
- Kubínová, L., and Kutík, J.** (2007). Surface density and volume density measurements of chloroplast thylakoids in maize (*Zea mays* L.) under chilling conditions. *Photosynthetica* **45**, 481-488.
- Kubínová, Z., Janáček, J., Lhotáková, Z., Kubínová, L., and Albrechtová, J.** (2014). Unbiased estimation of chloroplast number in mesophyll cells: advantage of a genuine three-dimensional approach. *Journal of Experimental Botany* **65**, 609-620.
- Kubínová, L., and Albrechtová, J.** (1999). *Stereology in Plant Anatomy*. (Charles University in Prague: Department of Plant Physiology).
- Kupper, P., Sellin, A., Klimánková, Z., Pokorný, R., and Puertolas, J.** (2006). Water relations in Norway spruce trees growing at ambient and elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Biologia Plantarum* **50**, 603-609.
- Kurasová, I., Kalina, J., Urban, O., Štroch, M., and Špunda, V.** (2003). Acclimation of two distinct plant species, spring barley and Norway spruce, to combined effect of various irradiance and CO<sub>2</sub> concentration during cultivation in controlled environment. *Photosynthetica* **41**, 513-523.
- Kurz, W.A., Stinson, G., Rampley, G.J., Dymond, C.C., and Neilson, E.T.** (2008). Risk of natural disturbances makes future contribution of Canada's forests to the global carbon cycle highly uncertain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1551-1555.
- Kutík, J., Nátr, L., Demmers-Derks, H.H., and Lawlor, D.W.** (1995). Chloroplast ultrastructure of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivated in normal and elevated CO<sub>2</sub> concentrations with two contrasted nitrogen supplies. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1797-1802.
- Kutík, J., Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Haisel, D., Wilhelmová, N., and Tichá, 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**, 447-455.
- Lhotáková, Z., Albrechtová, J., Janáček, J., and Kubínová, L.** (2008). Advantages and pitfalls of using free-hand sections of frozen needles for three-dimensional analysis of mesophyll by stereology and confocal microscopy. *Journal of Microscopy* **232**, 56-63.
- Lhotáková, Z., Urban, O., Dubánková, M., Cvikrová, M., Tomášková, I., Kubínová, L., Zvára, K., Marek, M.V., and Albrechtová, J.** (2012). The impact of long-term CO<sub>2</sub> enrichment on sun and shade needles of Norway spruce (*Picea abies*): Photosynthetic performance, needle anatomy and phenolics accumulation. *Plant Science* **188**, 60-70.
- Li, M.-c., Kong, G.-q., and Zhu, J.-j.** (2009). Vertical and leaf-age-related variations of nonstructural carbohydrates in two alpine timberline species, southeastern Tibetan Plateau. *Journal of Forest Research* **14**, 229-235.
- Lin, J.X., Jach, M.E., and Ceulemans, R.** (2001). Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO<sub>2</sub>. *New Phytologist* **150**, 665-674.
- Liu, W.P., Kozovits, A.R., Grams, T.E.E., Blaschke, H., Rennenberg, H., and Matussek, R.** (2004). Competition modifies effects of enhanced ozone/carbon dioxide concentrations on carbohydrate and biomass accumulation in juvenile Norway spruce and European beech. *Tree Physiology* **24**, 1045-1055.

- Liu, X.P., Grams, T.E.E., Matyssek, R., and Rennenberg, H.** (2005). Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and/or pO<sub>3</sub> on C-, N-, and S-metabolites in the leaves of juvenile beech and spruce differ between trees grown in monoculture and mixed culture. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 147-154.
- Lomský, B., Šrámek, V., and Novotný, R.** (2012). Changes in the air pollution load in the Jizera Mts.: effects on the health status and mineral nutrition of the young Norway spruce stands. *European Journal of Forest Research* **131**, 757-771.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Rogers, A., and Ort, D.R.** (2004). Rising atmospheric carbon dioxide: Plants face the future. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 591-628.
- Lopez, R., Climent, J., and Gil, L.** (2008). From desert to cloud forest: the non-trivial phenotypic variation of Canary Island pine needles. *Trees-Structure and Function* **22**, 843-849.
- Lukjanova, A., and Mandre, M.** (2010). Effects of Alkalization of the Environment on the Anatomy of Scots Pine (*Pinus sylvestris*) Needles. *Water Air and Soil Pollution* **206**, 13-22.
- Lukjanova, A., Mandre, M., and Saarman, G.** (2013). Impact of Alkalisiation of the Soil on the Anatomy of Norway Spruce (*Picea abies*) Needles. *Water Air and Soil Pollution* **224**.
- Luomala, E.M., Laitinen, K., Sutinen, S., Kellomaki, S., and Vapaavuori, E.** (2005). Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO<sub>2</sub> and temperature. *Plant Cell and Environment* **28**, 733-749.
- Mandre, M.** (2003). Ecophysiological study of suitability of *Picea mariana* L. for afforestation in alkalinized territories in northeast Estonia. *Oil Shale* **20**, 143-160.
- Mandre, M., Kloseiko, J., Ots, K., and Tuulmets, L.** (1999). Changes in phytomass and nutrient partitioning in young conifers in extreme alkaline growth conditions. *Environmental Pollution* **105**, 209-220.
- Marek, M., V.** (2011). Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu. (Prague: Academia).
- Maslova, T.G., Mamushina, N.S., Sherstneva, O.A., Bubolo, L.S., and Zubkova, E.K.** (2009). Seasonal structural and functional changes in the photosynthetic apparatus of evergreen conifers. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**, 607-615.
- Mašková, P., Radochová, B., Lhotáková, Z., Michálek, J., and Lipavská, H.** (in preparation). Nonstructural carbohydrate status response to long-term elevated CO<sub>2</sub> exposure in trees of European beech and Norway spruce grown in a mix culture: biochemical and ultrastructural view.
- McGrath, J.M., and Lobell, D.B.** (2013). Regional disparities in the CO<sub>2</sub> fertilization effect and implications for crop yields. *Environmental Research Letters* **8**.
- Muilu-Makela, R., Vuosku, J., Laara, E., Saarinen, M., Heiskanen, J., Haggman, H., and Sarjala, T.** (2015). Water availability influences morphology, mycorrhizal associations, PSII efficiency and polyamine metabolism at early growth phase of Scots pine seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **88**, 70-81.
- Mullineaux, C.W., and Emlyn-Jones, D.** (2005). State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *Journal of Experimental Botany* **56**, 389-393.
- Niinemets, U.** (1997). Role of foliar nitrogen in light harvesting and shade tolerance of four temperate deciduous woody species. *Functional Ecology* **11**, 518-531.

- Niinemets, U.** (1999). Components of leaf dry mass per area - thickness and density - alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytologist* **144**, 35-47.
- Niinemets, U., and Kull, O.** (1998). Stoichiometry of foliar carbon constituents varies along light gradients in temperate woody canopies: implications for foliage morphological plasticity. *Tree Physiology* **18**, 467-479.
- Niinemets, U., Cescatti, A., Rodeghiero, M., and Tosens, T.** (2006). Complex adjustments of photosynthetic potentials and internal diffusion conductance to current and previous light availabilities and leaf age in Mediterranean evergreen species *Quercus ilex*. *Plant Cell and Environment* **29**, 1159-1178.
- Niinemets, U., Lukjanova, A., Turnbull, M.H., and Sparrow, A.D.** (2007). Plasticity in mesophyll volume fraction modulates light-acclimation in needle photosynthesis in two pines. *Tree Physiology* **27**, 1137-1151.
- Ohira, S., Morita, N., Suh, H.J., Jung, J., and Yamamoto, Y.** (2005). Quality control of Photosystem II under light stress - turnover of aggregates of the D1 protein in vivo. *Photosynthesis Research* **84**, 29-33.
- Ots, K., and Mandre, M.** (2012). Monitoring of heavy metals uptake and allocation in *Pinus sylvestris* organs in alkalised soil. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**, 4105-4117.
- Palomäki, V., Laitinen, K., Holopainen, T., and Kellomäki, S.** (1996). First-year results on the effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> concentrations on needle ultrastructure and gas exchange responses of Scots pine saplings. *Silva Fennica* 30(2-3): 123-134.
- Panek, J.A., and Goldstein, A.H.** (2001). Response of stomatal conductance to drought in ponderosa pine: implications for carbon and ozone uptake. *Tree Physiology* **21**, 337-344.
- Pavlová, L.** (2005). *Fyziologie rostlin*. (Prague: Karolinum).
- Pell, E.J., Eckardt, N., and Enyedi, A.J.** (1992). Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist* **120**, 397-405.
- Pokorný, R., Tomášková, I., and Marek, M.V.** (2011). The effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on Norway spruce needle parameters. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 2269-2277.
- Pritchard, S.G., Peterson, C.M., Prior, S.A., and Rogers, H.H.** (1997). Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> differentially affects needle chloroplast ultrastructure and phloem anatomy in *Pinus palustris*: Interactions with soil resource availability. *Plant Cell and Environment* **20**, 461-471.
- Pritchard, S.G., Mosjidis, C., Peterson, C.M., Runion, G.B., and Rogers, H.H.** (1998). Anatomical and morphological alterations in longleaf pine needles resulting from growth in elevated CO<sub>2</sub>: Interactions with soil resource availability. *International Journal of Plant Sciences* **159**, 1002-1009.
- Radochová, B., Lhotáková, Z., Janáček, J., Čapek, M., Kubínová, L., and Albrechtová, J.** (2013). Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na ultrastrukturu chloroplastů smrku ztepilého. In *Zborník príspevkov z konferencie 11. dni doktorandov experimentálnej biológie rastlín a 13. konferencie experimentálnej biológie rastlín (Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach, Slovensko)*, pp. 176.
- Raeim, O., Kaurilind, E., Hallik, L., and Merilo, E.** (2012). Why does needle photosynthesis decline with tree height in Norway spruce? *Plant Biology* **14**, 306-314.

- Rasse, D.P., and Tocquin, P.** (2006). Leaf carbohydrate controls over Arabidopsis growth and response to elevated CO<sub>2</sub>: an experimentally based model. *New Phytologist* **172**, 500-513.
- Roberntz, P.** (1999). Effects of long-term CO<sub>2</sub> enrichment and nutrient availability in Norway spruce. I. Phenology and morphology of branches. *Trees-Structure and Function* **13**, 188-198.
- Sallas, L., Luomala, E.M., Utriainen, J., Kainulainen, P., and Holopainen, J.K.** (2003). Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. *Tree Physiology* **23**, 97-108.
- Saxe, H., Ellsworth, D.S., and Heath, J.** (1998). Tree and forest functioning in an enriched CO<sub>2</sub> atmosphere. *New Phytologist* **139**, 395-436.
- Selsted, M.B., Ambus, P., Michelsen, A., van der Linden, L., Larsen, K.S., Pilegaard, K., Mikkelsen, T.N., and Beier, C.** (2011). Measurement of carbon dioxide fluxes in a free-air carbon dioxide enrichment experiment using the closed flux chamber technique. *Atmospheric Environment* **45**, 208-214.
- Senser, M., Schotz, F., and Beck, E.** (1975). Seasonal-changes in structure and function of Spruce chloroplasts. *Planta* **126**, 1-10.
- Shipton, C.A., and Barber, J.** (1994). In-vivo and in-vitro photoinhibition reactions generate similar degradation fragments of D1 and D2 photosystem-II reaction-center proteins. *European Journal of Biochemistry* **220**, 801-808.
- Siefermann-Harms, D., Boxler-Baldoma, C., von Wilpert, K., and Heumann, H.G.** (2004). The rapid yellowing of spruce at a mountain site in the Central Black Forest (Germany). Combined effects of Mg deficiency and ozone on biochemical, physiological and structural properties of the chloroplasts. *Journal of Plant Physiology* **161**, 423-437.
- Slaney, M., Wallin, G., Medhurst, J., and Linder, S.** (2007). Impact of elevated carbon dioxide concentration and temperature on bud burst and shoot growth of boreal Norway spruce. *Tree Physiology* **27**, 301-312.
- Soda, C., Bussotti, F., Grossoni, P., Barnes, J., Mori, B., and Tani, C.** (2000). Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. *Environmental and Experimental Botany* **44**, 69-82.
- Soikkeli, S.** (1978). Seasonal-changes in mesophyll ultrastructure of needles of Norway Spruce (*Picea abies*). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **56**, 1932-1940.
- Soukupová, J., Cvikrová, M., Albrechtová, J., Rock, B.N., and Eder, J.** (2000). Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *New Phytologist* **146**, 403-414.
- Špunda, V., Kalina, J., Urban, O., Luis, V.C., Sibisse, I., Puertolas, J., Šprtová, M., and Marek, M.V.** (2005). Diurnal dynamics of photosynthetic parameters of Norway spruce trees cultivated under ambient and elevated CO<sub>2</sub>: the reasons of midday depression in CO<sub>2</sub> assimilation. *Plant Science* **168**, 1371-1381.
- Spurr, A.R.** (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**, 31-&.
- Stark, J.R., and Lynn, A.** (1992). Starch granules large and small. *Biochemical Society Transactions* **20**, 7-12.
- Stinziano, J.R., and Way, D.A.** (2014). Combined effects of rising CO<sub>2</sub> and temperature on boreal forests: growth, physiology and limitations. *Botany* **92**, 425-436.



- Streit, K., Rinne, K.T., Hagedorn, F., Dawes, M.A., Saurer, M., Hoch, G., Werner, R.A., Buchmann, N., and Siegwolf, R.T.W.** (2013). Tracing fresh assimilates through *Larix decidua* exposed to elevated CO<sub>2</sub> and soil warming at the alpine treeline using compound-specific stable isotope analysis. *New Phytologist* **197**, 838-849.
- Štroch, M., Kuldová, K., Kalina, J., and Špunda, V.** (2008). Dynamics of the xanthophyll cycle and non-radiative dissipation of absorbed light energy during exposure of Norway spruce to high irradiance. *Journal of Plant Physiology* **165**, 612-622.
- Štroch, M., Vrabl, D., Podolinská, J., Kalina, J., Urban, O., and Špunda, V.** (2010). Acclimation of Norway spruce photosynthetic apparatus to the combined effect of high irradiance and temperature. *Journal of Plant Physiology* **167**, 597-605.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., and Murphy, A.** (2015). *Plant Physiology and Development*. (USA: Sinauer Associates).
- Uprety, D.C., Garg, S.C., Bisht, B.S., Maini, H.K., Dwivedi, N., Paswan, G., Raj, A., and Saxena, D.C.** (2006). Carbon dioxide enrichment technologies for crop response studies. *Journal of Scientific & Industrial Research* **65**, 859-866.
- Urban, O., Janouš, D., Pokorný, R., Marková, I., Pavelka, M., Fojtík, Z., Šprtová, M., Kalina, J., and Marek, M.V.** (2001). Glass domes with adjustable windows: A novel technique for exposing juvenile forest stands to elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Photosynthetica* **39**, 395-401.
- Urban, O., Janouš, D., Acosta, M., Czerný, R., Marková, I., Navrátil, M., Pavelka, M., Pokorný, R., Šprtová, M., Zhang, R., Špunda, V., Grace, J., and Marek, M.V.** (2007). Ecophysiological controls over the net ecosystem exchange of mountain spruce stand. Comparison of the response in direct vs. diffuse solar radiation. *Global Change Biology* **13**, 157-168.
- Utriainen, J., Janhunen, S., Helmisaari, H.S., and Holopainen, T.** (2000). Biomass allocation, needle structural characteristics and nutrient composition in Scots pine seedlings exposed to elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> concentrations. *Trees-Structure and Function* **14**, 475-484.
- Votrubová, O.** (2011). *Anatomie rostlin*. (Prague: Karolinum).
- Vrbová, A., Radochová, B., Lhotáková, Z., and Albrechtová, J.** (2013). Ultrastruktura chloroplastů buku lesního pod vlivem zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a různé ozářenosti. In *Zborník príspevkov z konferencie 11. dni doktorandov experimentálnej biológie rastlín a 13. konferencie experimentálnej biológie rastlín* (Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach, Slovensko), pp. 177.
- Walters, R.G.** (2005). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany* **56**, 435-447.
- Wang, K.Y., Kellomaki, S., and Laitinen, K.** (1996). Acclimation of photosynthetic parameters in Scots pine after three years exposure to elevated temperature and CO<sub>2</sub>. *Agricultural and Forest Meteorology* **82**, 195-217.
- Wang, X.Z., Anderson, O.R., and Griffin, K.L.** (2004). Chloroplast numbers, mitochondrion numbers and carbon assimilation physiology of *Nicotiana sylvestris* as affected by CO<sub>2</sub> concentration. *Environmental and Experimental Botany* **51**, 21-31.
- Wen, K., Liang, C., Wang, L., Hu, G., and Zhou, Q.** (2011). Combined effects of lanthanum ion and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in soybean seedlings. *Chemosphere* **84**, 601-608.

- Weston, D.J., and Bauerle, W.L.** (2007). Inhibition and acclimation of C3 photosynthesis to moderate heat: a perspective from thermally contrasting genotypes of *Acer rubrum* (red maple). *Tree Physiology* **27**, 1083-1092.
- Wibel, E., R.** (1979). *Stereological Methods*. (London: Academic Press).
- Woodruff, D.R., Meinzer, F.C., Lachenbruch, B., and Johnson, D.M.** (2009). Coordination of leaf structure and gas exchange along a height gradient in a tall conifer. *Tree Physiology* **29**, 261-272.
- Xu, S., Zhu, X., Li, C., and Ye, Q.** (2014). Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on photosynthesis and growth in *Gerbera jamesonii*. *Scientia Horticulturae* **177**, 77-84.
- Zellnig, G., Perktold, A., and Zechmann, B.** (2010). Fine structural quantification of drought-stressed *Picea abies* (L.) organelles based on 3D reconstructions. *Protoplasma* **243**, 129-136.
- Zhang, R., Wise, R.R., Struck, K.R., and Sharkey, T.D.** (2010). Moderate heat stress of *Arabidopsis thaliana* leaves causes chloroplast swelling and plastoglobule formation. *Photosynthesis Research* **105**, 123-134.

## 7.1. Internetové zdroje:

**Recent monthly mean CO<sub>2</sub> at Mauna Loa:**

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

**CzechGlobe, Ústavu výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i.:**

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

**CzechGlobe, Integrovaný systém sledování sucha:**

<http://www.intersucho.cz/cz/mapy/intenzita-sucha/>