



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO NA AKTIVITU A OBSAH ENZYMU RUBISCO VE SLUNNÝCH A STINNÝCH LISTECH BUKU LESNÍHO

INFLUENCE OF ELEVATED CARBON DIOXIDE CONCENTRATION AT RUBISCO ACTIVITY  
AND ITS CONTENT IN SUNNY AND SHADED LEAVES OF BEECH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MAGDA VIČÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2009



## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0378/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Magda Vičíková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí bakalářské práce: **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**  
Konzultanti bakalářské práce:

### Název bakalářské práce:

Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního

### Zadání bakalářské práce:

1. Srovnat aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého.
2. Potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech, popř. popsat její průběh.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Magda Vičíková  
Student(ka)

-----  
PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

VIČÍKOVÁ, M. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 48 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že bakalářská práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje byla správně a úplně citovány. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za odborné vedení a podporu. Také bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za vyhodnocení výsledků metody SDS-PAGE.*

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního (*Fagus sylvatica*). U odebraných vzorků byla měřena počáteční a celková aktivita spektrofotometricky. Obsah enzymu Rubisco byl stanoven elektroforeticky metodou SDS-PAGE.

U listů kultivovaných při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého byla prokázána významně vyšší aktivita enzymu Rubisco v červnu, avšak nikoliv v září. Naopak, expozice listů (slunné/stinné) neměla významný vliv na aktivitu Rubisco v červnu, naproti tomu v září byla u stinných listů naměřena nižší aktivita Rubisco než u listů slunných a tyto rozdíly byly na hranici statistické významnosti.

Obsah Rubisco byl statisticky významně nižší u listů kultivovaných při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého (aklimační deprese), s výjimkou stinných listů v září. U stinných listů byl zjištěn významně nižší obsah Rubisco než u listů slunných jak v červnu, tak v září.

## **Abstract**

This bachelor thesis focuses on influence of elevated carbon dioxide concentration at Rubisco activity and its content in sunny and shaded leaves of beech (*Fagus sylvatica*). The initial and total activities were measured spectrophotometrically, the content of Rubisco was determined by using SDS-PAGE method.

It was observed statistically significant higher activity of Rubisco in leaves cultivated under elevated concentration of carbon dioxide in June but not in September. In contrary, exposure of leaves (sunny/shaded) did not have significant influence on Rubisco activity in June, but in September was found lower activity of Rubisco in shaded leaves than in sunny leaves.

The content of Rubisco was lower in leaves cultivated under elevated concentration of carbon dioxide (acclimation), with the exception of shaded leaves in September. There was found significantly lower Rubisco content in shaded leaves than in sunny leaves both in June and in September.

## **Klíčová slova**

buk lesní, aktivita a obsah Rubisco, slunné a stinné listy, aklimace

## **Keywords**

beech, Rubisco activity and content, sunny and shaded leaves, acclimation

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>7</b>
2.1	FOTOSYNTÉZA.....	7
2.1.1	<i>Chloroplasty</i> .....	7
2.1.2	<i>Světelná fáze</i> .....	8
2.1.3	<i>Temnostní reakce</i> .....	10
2.2	RIBULOZA-1,5-BISFOSFÁTKARBOXYLASA/OXYGENASA .....	11
2.3	VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO <sub>2</sub> NA ROSTLINY.....	14
2.3.1	<i>Přímé účinky</i> .....	15
2.3.2	<i>Nepřímé účinky</i> .....	17
2.4	METODY STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU RUBISCO .....	18
2.4.1	<i>Aktivita</i> .....	18
2.4.2	<i>Stanovení aktivity in vivo</i> .....	18
2.4.3	<i>Stanovení aktivity in vitro</i> .....	18
2.5	METODY STANOVENÍ MNOŽSTVÍ RUBISCO .....	19
2.5.1	<i>HPLC</i> .....	19
2.5.2	<i>Gelová elektroforéza</i> .....	19
2.5.3	<i>Kapilární elektroforéza</i> .....	20
2.5.4	<i>Imunologické metody</i> .....	20
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>21</b>
3.1	MATERIÁL.....	21
3.2	METODY.....	21
3.2.1	<i>Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco</i> .....	21
3.2.2	<i>Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco</i> .....	26
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>31</b>
4.1	VÝSLEDKY .....	31
4.1.1	<i>Aktivita enzymu Rubisco</i> .....	31
4.1.2	<i>Obsah enzymu Rubisco</i> .....	35
4.2	DISKUZE.....	42
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM SYMBOLŮ</b> .....	<b>48</b>

## 1 Úvod

Nejvýznamnějším dějem zajišťujícím převedení uhlíku z jeho oxidované formy o nízké energii na vysoce energetickou, redukovanou formu je fotosyntéza. Na procesu převedení anorganického uhlíku do organické podoby se podílí nejdůležitější enzym fotosyntézy ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa, neboli Rubisco. Tento enzym se vyznačuje velmi malou molekulovou aktivitou, za jednu sekundu přemění pouze několik molekul substrátu. Kinetika enzymu Rubisco je právě limitující faktor rychlosti fotosyntézy, proto je jeho neúčinnost kompenzována jeho vysokým obsahem v rostlinách. Tvoří asi 50 % rozpustných rostlinných bílkovin a je nejhojnějším enzymem na Zemi.

Z důvodu možného nedostatku potravin pro světovou populaci v příštích desetiletích se genové inženýrství zaměřuje právě na enzym Rubisco. Snahou je získat efektivnější enzym, čímž by došlo ke zvýšení výnosů hospodářských plodin. Zvýšení výnosů by také mohlo zajistit současné zvyšování koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře.

Při krátkodobém zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> dojde u rostlin ke zvýšení rychlosti fotosyntézy, avšak při dlouhodobější kultivaci dojde k poklesu tohoto přírůstku. Poklesne také obsah a aktivita enzymu Rubisco, obsah celkového dusíku a rozpustných bílkovin. Tento soubor fyziologických změn, k nimž dochází právě při dlouhodobé kultivaci rostlin v podmínkách zvýšené koncentrace oxidu uhličitého se nazývá aklimační deprese.

Vlivem zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na rostliny se u nás zabývá Ústav systémové biologie a ekologie Akademie věd ČR. Experimentální ekologické pracoviště tohoto ústavu se nachází v Moravskoslezských Beskydech na Bílém kříži a hlavní výzkum je zaměřen na studium vlivů globálních změn na lesní ekosystémy. Na tomto pracovišti byly vybudovány kultivační sféry s normální a zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>. Zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého jsou modelovány podmínky očekávané v průběhu několika příštích desetiletí.

Významnou roli při výzkumu globálních změn hraje měření aktivity Rubisco, ta však v případě Rubisco nevyjadřuje množství enzymu. Rubisco se totiž vyskytuje v aktivované a inaktivované formě, přičemž pouze aktivovaná forma je schopná katalýzy a projevuje se určitou aktivitou. Inaktivní část enzymu Rubisco není možné stanovit měřením aktivity. Spolu s aktivitou je tedy nutné měřit i obsah enzymu Rubisco, což je veličina vhodnější pro dlouhodobá pozorování nežli aktivita.

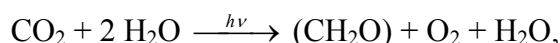
Cílem předložené bakalářské práce bylo stanovit počáteční a celkovou aktivitu a množství enzymu Rubisco v listech buku lesního (*Fagus sylvatica*) a potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco. Aktivita i množství byly stanoveny pro slunné a stinné listy kultivované při normální a zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. Práce je součástí grantového projektu Změny aktivity a obsahu enzymu Rubisco při působení zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>, na kterém se podílejí Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, Katedra fyziky Ostravské univerzity a ÚCHPBT Fakulty chemické VUT v Brně.

## 2 Současný stav řešené problematiky

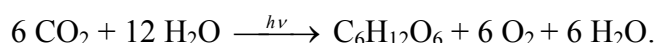
### 2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jeden z nejdůležitějších dějů v živé přírodě. Zachycuje sluneční energii a z nejjednodušší sloučeniny uhlíku, oxidu uhličitého, vyrábí organickou hmotu pro výživu chemotrofů. Je hlavním producentem kyslíku na Zemi, který je nepostradatelný pro existenci aerobních organismů.

Z fyzikálního hlediska je fotosyntéza přeměnou energie slunečního záření na energii chemickou. Chemicky představuje fotosyntéza převedení uhlíku z nejméně oxidované formy o nízké energii na redukovaný materiál o vysoké energii – sacharidy. Je to tedy silně endergonický redukční proces, kdy energii poskytuje sluneční záření, zachycované fotoreceptory (chlorofylem) a redukční síla pochází u vyšších rostlin z vodíku vody. Redukce CO<sub>2</sub> na cukry je spřažena s oxidací H<sub>2</sub>O, vedoucí ke vzniku O<sub>2</sub>,



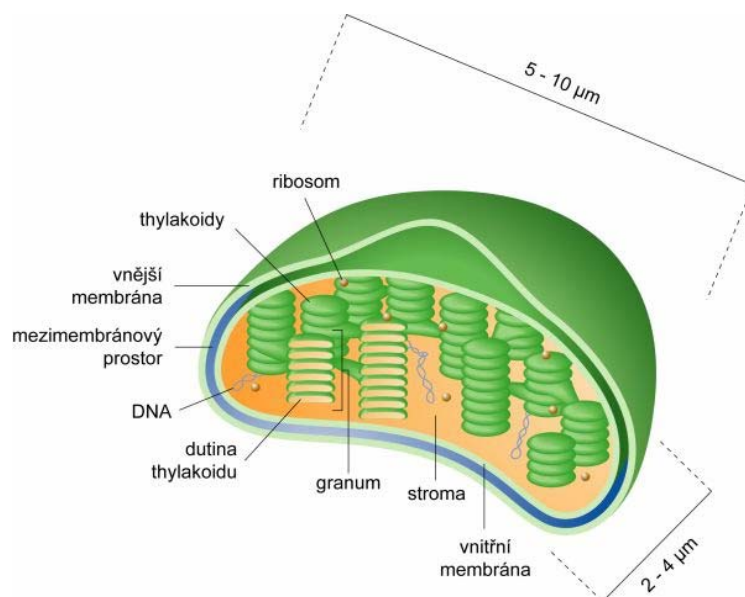
kde (CH<sub>2</sub>O) představuje monosacharidovou jednotku, jejíž vznik vystihuje sumární rovnice



Fotosyntéza zahrnuje dvě oddělené, ale na sebe navazující fáze – světlou (světelnou, primární procesy, fotosyntetický přenos elektronů) a temnou (temnostní, sekundární procesy, Calvinův cyklus). Světelná fáze je fotochemický děj spočívající v přeměně energie fotonů slunečního záření na energii chemickou. Energie záření se nejprve mění na energii excitovaných elektronů, která se pak používá na výrobu makroergických sloučenin: ATP – zdroje chemické energie a NADPH – energií bohatého redukovačla. Temnostní fáze se sestává ze série enzymových reakcí, které využívají energii a redukovačlo, vyrobené ve světelné fázi, k redukci CO<sub>2</sub> na cukry. Reakce temné fáze probíhají v cyklických sledech.

#### 2.1.1 Chloroplasty

Celý proces fotosyntézy probíhá u eukaryotních buněk ve specializovaných plastidech zvaných chloroplasty. Jsou to diskovité útvary bohaté na membrány, délky asi 5–10 μm a tloušťky asi 2–4 μm [1]. Mají silně prostupnou vnější obalovou membránu a téměř nepropustnou vnitřní membránu. Obě jsou odděleny tenkým mezimembránovým prostorem. Prostor obklopený vnitřní membránou obsahuje stroma, tj. koncentrovaný roztok enzymů, v němž jsou dále obsaženy molekuly DNA, RNA a ribosomy, na nichž se syntetizují některé z chloroplastových bílkovin. Ve stromatu je uložena třetí soustava membrán, thylakoidy, které tvoří uvnitř chloroplastu shluky zvané grana. Tyto útvary jsou propojeny stromálními thylakoidy. Průměrný chloroplast obsahuje 10 až 100 gran [2].



Obr. 2.1 Řez chloroplastem. Převzato z [3].

## 2.1.2 Světelná fáze

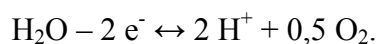
Prvním stupněm fotosyntézy je absorpce záření chlorofylovými molekulami, které se nacházejí na thylakoidech. Chlorofyl je cyklický tetrapyrrol s centrálním iontem hořečnatým ( $Mg^{2+}$ ). Za absorpci fotonů jsou odpovědné převážně  $\pi$ -elektrony systému konjugovaných dvojných vazeb, které se v chlorofylu nacházejí. Molekuly chlorofylu jsou většinou vázány na molekuly speciálních bílkovin, které je udržují optimálně nasměrované, aby si mohly předávat absorbovanou energii. Nashromážděná energie fotonů je pak přenesena na molekulu chlorofylu *a* v reakčním centru, kde se přemění na energii elektrickou. Podstatou této přeměny je přechod některých elektronů molekuly chlorofylu do hladiny o vyšší energii.

### 2.1.2.1 Fotosystém I a II

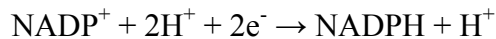
Při fotosyntéze spolupracují dva fotosystémy. První vyrábí silné redukční činidlo, které redukuje  $NADP^+$ , druhý naopak silné oxidační činidlo  $O_2$ , které produkuje z vody. Oba fotosystémy s příslušnými soubory oxidoreduktas jsou na každém thylakoidu umístěny odděleně a jsou propojeny řetězcem transelektronas.

Fotosystém I ( $P_I$ ) obsahuje převážně molekuly chlorofylu *a*, s absorpčním maximem asi 700 nm. Většinou jsou vázány na molekuly nosičové bílkoviny. Přenosem fotonů dojde k uvolnění elektronů molekuly chlorofylu v reakčním centru (označovaná jako  $P_{700}$ ) a k jejímu přechodu do excitovaného stavu  $P_{700}^*$ . Uvolněné elektrony jsou pak pomocí oxidoreduktasy přeneseny na  $NADP^+$  za vzniku NADPH. Potřebné protony pocházejí z fotolýzy vody, spřažené s fotosystémem II.

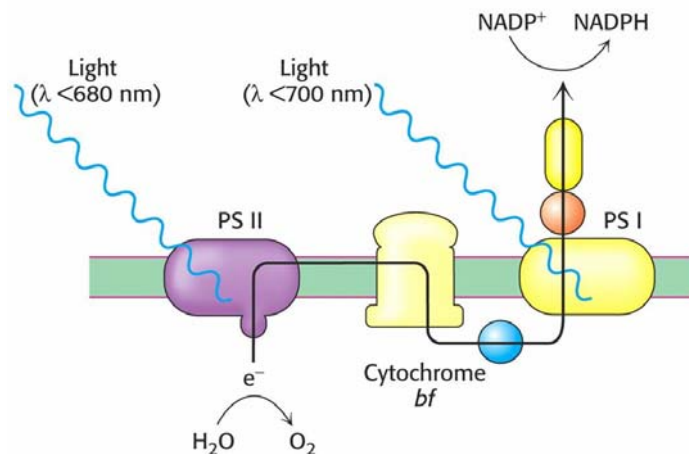
Fotosystém II ( $P_{II}$ ) obsahuje molekuly chlorofylu *a* i *b*, opět většinou vázané na nosičové bílkoviny. Absorpční maximum  $P_{II}$  je asi 680 nm. Molekula chlorofylu v reakčním centru (označovaná jako  $P_{680}$ ) přejde ozářením do excitovaného stavu  $P_{680}^*$ . Elektrony se pak přenáší systémem oxidoreduktas a převedou excitovanou molekulu chlorofylu v reakčním centru  $P_{700}$  fotosystému I do základního stavu. Uvolněním elektronů z  $P_{680}^*$  a jejich přechodem na  $P_{700}$  vznikne oxidovaná forma chlorofylu  $P_{680}$ , která oxiduje vodu za uvolnění  $O_2$



Elektrony odebrané vodě redukuje  $P_{680}$  a protony jsou použity při redukcí  $NADP^+$  ve fotosystému I.



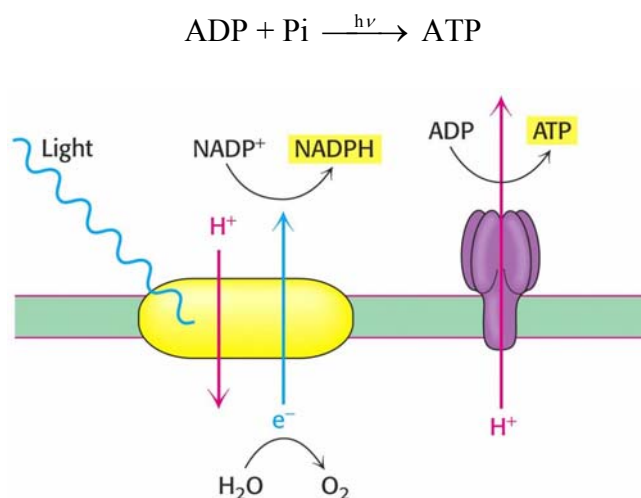
Pro elektrony pocházející z excitovaného centra  $P_{700}^*$  existuje ještě druhá alternativa. Probíhá jako cyklická fotofosforylace. Excitované elektrony jsou převáděny přes systém oxidoreduktas zpět na molekulu chlorofylu do reakčního centra, která se tím regeneruje zpět do základního stavu. Cyklické fotofosforylace se neúčastní fotosystém II a nevzniká při něm  $NADPH$ , ani se neuvolňuje  $O_2$  z vody. Tato cesta je použita, když je poměr  $NADPH$  k  $NADP^+$  v buňce vysoký, takže není potřeba produkovat další redukce [1].



Obr. 2.2 Fotosystém I a II. Převzato z [4].

### 2.1.2.2 Transport elektronů a výroba ATP

K výrobě ATP dochází ve světelné fázi fotosyntézy spřažením s transportem elektronů. Toto spřažení umožňuje protonový gradient vzniklý přebytkem protonů na vnější straně membrány. Energie nahromaděná protonovým gradientem je použita na syntézu ATP. Vlastní tvorbu ATP katalyzuje ATP-syntetasa, která je součástí thylakoidové membrány [1].



Obr. 2.3 Spřažení transportu elektronů a ATP. Převzato z [4].

### 2.1.3 Temnostní reakce

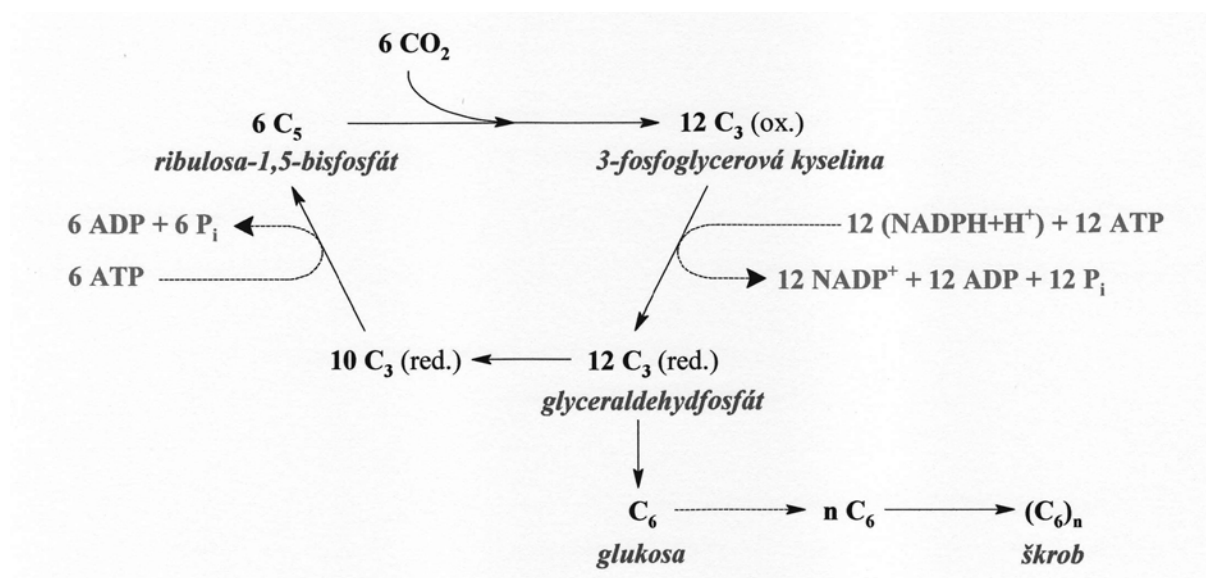
Temnou reakcí je biosyntéza sacharidů z  $\text{CO}_2$  za pomoci redukčního činidla NADPH a energie ATP nahromaděných ve světelné fázi. Nepotřebuje světelnou energii a probíhá ve tmě, pokud se nevyčerpají zásoby ATP a NADPH.

Biosyntéza sacharidů se odehrává v kapalně části chloroplastu (stroma) a v cytosolu a zahrnuje řadu enzymových reakcí. Je realizována několika metabolickými cestami. Nejznámější je tzv. hexosafosfátový – pentosafosfátový cyklus, nazývaný také podle objevitele Calvinův cyklus.

#### 2.1.3.1 Calvinův cyklus

Tento cyklický děj se skládá ze tří fází: fixace  $\text{CO}_2$  v organické formě, redukce aktivovaného  $\text{CO}_2$  za vzniku hexosy a regenerace akceptoru  $\text{CO}_2$ .

Fixace oxidu uhličitého slouží k převedení energeticky chudé, nereaktivní molekuly  $\text{CO}_2$  na aktivovanou redukovatelnou formu. Cukerný fosfát ribulosa-1,5-bisfosfát přijme molekulu  $\text{CO}_2$  a přejde na nestabilní šestiuhlíkatý meziprodukt, který se ihned rozštěpí na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Ten se v redukční fázi redukuje s NADPH za spotřeby ATP na glyceraldehyd-3-fosfát a poté isomerací na dihydroxyacetonfosfát. Část trios přechází chloroplastovou membránou do cytosolu buňky, kde se přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát, odštěpením fosforylové skupiny a isomerací na glukosa-6-fosfát. K regeneraci ribulosa-5-fosfátu dochází složitým procesem zahrnujícím řadu reakcí vzájemných přeměn cukrů – transglykosidačních reakcí zbylých trios. Během jednoho cyklu vznikne z pentosy hexosa a využije se jeden atom uhlíku asimilovatelného  $\text{CO}_2$ . Aby se z molekul oxidu uhličitého vyrobila hexosa, musí proběhnout cyklus šestkrát. Při tom se regeneruje 6 molekul ribulosa-1,5-bisfosfátu, čímž se cyklus uzavře.



Obr. 2.4 Schéma Calvinova cyklu. Převzato z [5].

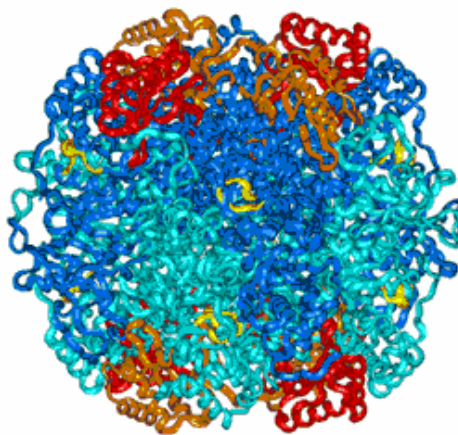
V Calvinově cyklu hraje důležitou roli enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco), který katalyzuje reakci oxidu uhličitého s ribulosa-1,5-bisfosfátem.

Většina rostlin a řas využívá k fixaci  $\text{CO}_2$  Calvinův cyklus. Tyto rostliny se označují jako C3-rostliny, protože prvním produktem asimilace je tříuhlíkatá sloučenina. U některých,

převážně tropických rostlin dochází k odlišné fixaci CO<sub>2</sub>, produktem asimilace je pak čtyřuhlíkatá sloučenina a označují se proto C<sub>4</sub>-rostliny [1].

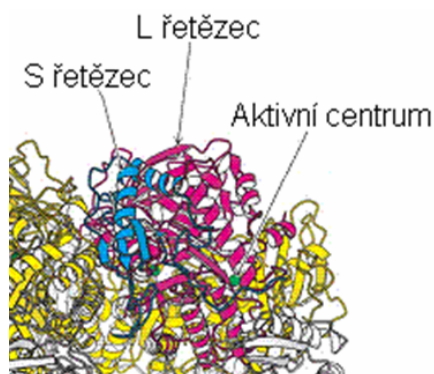
## 2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa

Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa, neboli Rubisco, je nejvýznamnější enzym na Zemi, neboť všechny život závisí na jeho činnosti. Tato bílkovina se nachází ve stromatu chloroplastů a představuje asi 15% chloroplastových bílkovin. Je to nejhojnější bílkovina v biosféře.



Obr. 2.5 Struktura enzymu Rubisco. Převzato z [9].

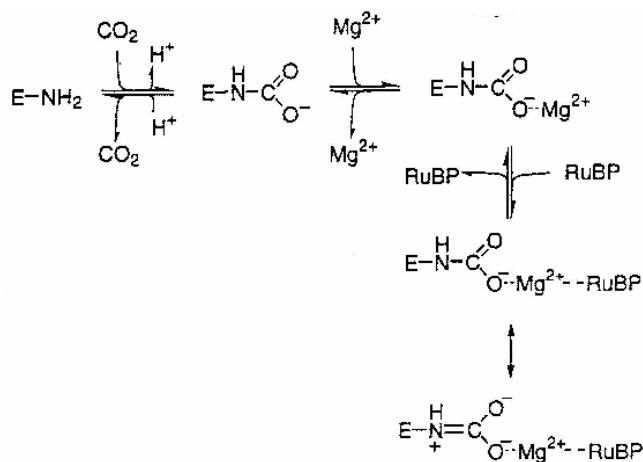
Rubisco má globulární strukturu a skládá se z osmi velkých podjednotek (L, 56 kDa) a z osmi malých podjednotek (S, 14 kDa). Velká podjednotka je kódována v chloroplastové DNA a je syntetizována na chloroplastových ribosomech. Obsahuje katalytické a regulační centrum enzymu. Je aktivní i v nepřítomnosti malých podjednotek. Malé podjednotky zvyšují katalytickou účinnost enzymu, jsou kódovány jaderným genomem a syntetizovány v cytosolu. Do chloroplastu jsou dopravovány za spotřeby ATP. Posttranslační úpravy enzymu probíhají za účasti chaperonů [2].



Obr. 2.6 Struktura aktivního centra. Převzato z [32].

Aby byl enzym Rubisco aktivní, musí nejprve dojít k aktivaci jeho katalytického centra. Nejdříve dochází k reverzibilní karbamylaci  $\epsilon$ -aminoskupiny postranního řetězce lysinu za vzniku karbamátu. Poté následuje koordinační vazba Mg<sup>2+</sup>. Tato vazba probíhá pouze

v nadbytku  $Mg^{2+}$  a v alkalickém prostředí. Na takto vytvořené aktivní místo se váže substrát ribulosa-1,5-bisfosfát [16]. Tuto aktivaci katalyzuje enzym aktivasa Rubisco. U mnoha druhů rostlin se nachází ještě další sloučenina, 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát, která inhibuje aktivitu Rubisco. Dokonalá regulace aktivity enzymu Rubisco je nutná ke sladění návaznosti reakcí [7].



Obr. 2.7 Aktivace enzymu Rubisco a navázání RuBP. Převzato z [16].

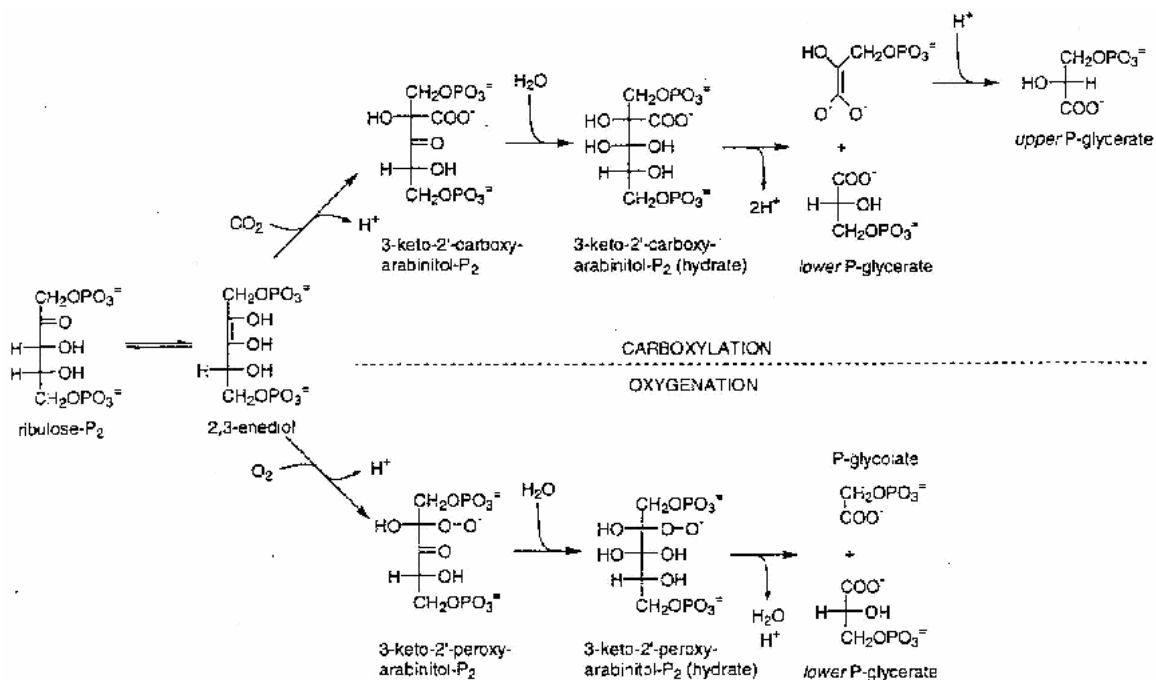
Regulace aktivity Rubisco slouží k regulaci Calvinova cyklu. Je totiž nutné, aby Calvinův cyklus probíhal jen ve dne, aby v noci nedošlo ke spotřebě katabolicky vytvořených ATP a NADPH k asimilaci  $CO_2$ . Na aktivitu Rubisco mají vliv tyto faktory:

1. Po osvětlení dojde ke změně pH ve stromatu z 7,0 na 8,0, neboť protony přecházejí ze stromatu do dutiny thylakoidu. Rubisco má právě ostré optimum u pH 8,0.
2. Tok protonů do thylakoidu je kompenzován tokem iontů  $Mg^{2+}$  do stromatu. Hořečnaté ionty jsou důležité pro aktivaci enzymu.
3. Činností fotosystému I vzniká po osvětlení NADPH, který allostericky aktivuje aktivitu enzymu.
4. Některé rostliny produkují ve tmě 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát, který silně inhibuje aktivitu Rubisco [2].

Aktivovaný enzym katalyzuje buď karboxylaci nebo oxygenaci ribulosa-1,5-bisfosfátu. Při karboxylaci nejdříve dochází k deprotonaci molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu za vzniku 2,3-enediolu. K tomuto meziproductu váže Rubisco oxid uhličitý za vzniku nestabilního šestiuhlíkatého meziproductu 3-keto-2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Jeho hydrolýzou pak vznikají dvě molekuly 3-fosfoglycerátu.

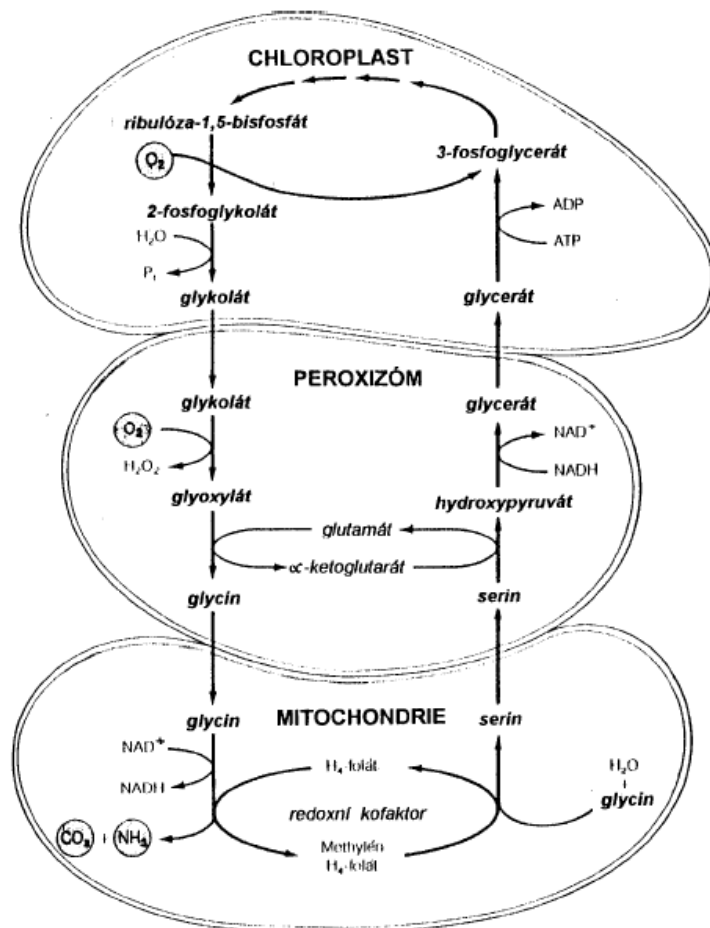
Rubisco může vázat na stejný substrát, tj. ribulosa-1,5-bisfosfát, i kyslík. Tento proces se nazývá fotorespirace a jeho začátek je stejný jako u karboxylace. Nejdříve dojde k deprotonaci ribulosa-1,5-bisfosfátu, vzniká enolický meziproduct a na ten váže Rubisco molekulu kyslíku. Vzniká 3-keto-2-peroxyarabinitol-1,5-bisfosfát a po hydrolýze vzniká fosfoglykolát a fosfoglycerát. Z fosfoglykolátu se následně odštěpuje fosfátová skupina a vzniklý glykolát je transportován z chloroplastu do peroxisomů. Tam dochází k jeho oxidaci na glyoxylát a transaminací vzniká glycin. Na reakce v peroxisomu navazují reakce v mitochondriích, a to tvorba jedné molekuly serinu ze dvou molekul glycinu. Při této reakci se uvolňuje jedna molekula  $CO_2$  a  $NH_3$ . Serin může být buď využíván v dusíkovém metabolismu buňky, tj. k syntéze dalších aminokyselin a bílkovin, a nebo může být

transportován zpět do peroxisomů, kde po jeho transaminaci a redukci vzniká glycerát. Ten se pak v chloroplastech fosforyluje za účasti jedné molekuly ATP na 3-fosfoglycerát, který může být využit k regeneraci původního substrátu, ribulosa-1,5-bisfosfátu. Tím dochází k uzavření celého cyklu [7].



Obr. 2.8 Karboxylace a oxygenace RuBP katalyzovaná enzymem Rubisco. Převzato z [16].

Schopnost enzymu Rubisco přenášet CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> na tentýž substrát, má obvykle za následek značné snížení fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub>. Poměr mezi karboxylační a oxygenační aktivitou enzymu závisí především na poměru mezi koncentrací CO<sub>2</sub> a kyslíku v atmosféře. Za normálního složení atmosféry (21% obj. O<sub>2</sub> a 0,035% obj. CO<sub>2</sub>) je poměr mezi rychlosti karboxylace a oxygenace 2 : 1 až 3 : 1. To znamená, že jedna čtvrtina primárního substrátu využitelného v Calvinově cyklu podléhá fotorespiračním procesům a tedy i ztrátám uhlíku a energie [7].



Obr. 2.9 Průběh fotorespiračních reakcí. Převzato z [7].

I když má fotorespirace negativní vliv na celkovou efektivitu fixace  $CO_2$ , pro celkový metabolismus je tento proces důležitý. Fotorespirační cestou se vytváří nejvíce glycínu a serínu, fotorespirace je prospěšná i při odvádění přebytků ATP a redukčního potenciálu za silného záření a nedostatku  $CO_2$  [7].

### 2.3 Vliv zvýšené koncentrace $CO_2$ na rostliny

Účinky zvýšené koncentrace  $CO_2$  na rostliny můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. Přímé účinky se projevují změnami rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, vodivosti průduchů a rychlosti mitochondriální respirace. Přímé působení většinou vyvolává celou kaskádu následných změn, jejichž zaměření i velikost jsou navíc dotvářeny interakcí s ostatními faktory. Tyto faktory, neboli nepřímá působení, jsou hlavně teplota, obsah minerálních látek, obsah dusíku a vody. Tato nepřímá působení pak ovlivňují působení přímých účinků.

Účinky zvýšené koncentrace  $CO_2$  jsou navzájem provázané. Pokles obsahu dusíku vede ke změně růstové i udržovací složky dýchání. Pokles vodivosti průduchů zlepšující vodní bilanci rostlin může oddálit vznik vodního deficitu v poledních hodinách. Zvýšená účinnost využití vody a pokles rychlosti transpirace rostlin mění obsah vody v půdě i energetickou bilanci listů: snižuje se výdej energie transpirací a naopak se zvyšuje výdej tepla vedením do okolního vzduchu, což může způsobit zvýšení teploty nad kontinenty.

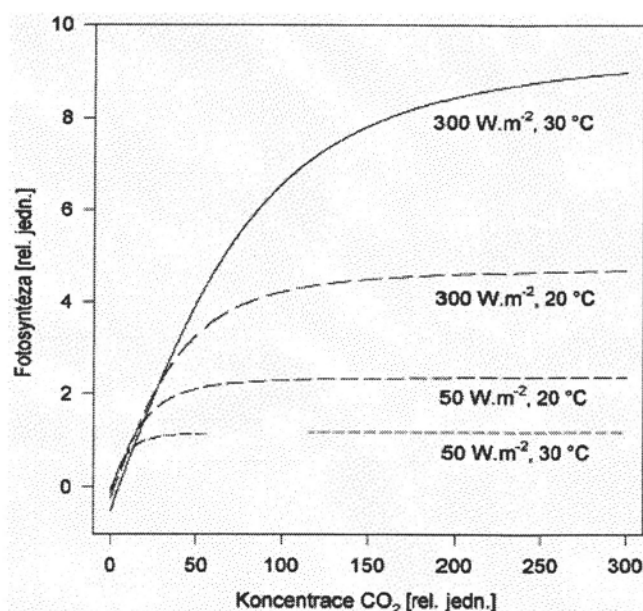
## 2.3.1 Přímé účinky

### 2.3.1.1 Rychlost fotosyntézy

Rychlost fotosyntézy jako funkce oxidu uhličitého je křivočará závislost s nasycením. Pro její matematický popis se používá modifikace rovnice Michaelise a Mentenové:

$$P = \frac{P_{\max} \cdot c_{CO_2}}{c_{CO_2} + K_C}$$

kde  $P$  je rychlost fotosyntézy,  $P_{\max}$  je maximální možná hodnota rychlosti fotosyntetického pochodu,  $c_{CO_2}$  je koncentrace oxidu uhličitého a  $K_C$  je konstanta analogická konstantě  $K_M$  z rovnice Michaelis-Mentenové. Tvar křivky je určen maximální hodnotou rychlosti fotosyntézy, ke které se křivka asymptoticky blíží. Hodnoty  $P_{\max}$  a  $K_M$  závisí na ozáření a teplotě [15].



Obr. 2.10 Závislost rychlosti fotosyntézy na koncentraci CO<sub>2</sub>. Převzato z [15].

U rostlin kultivovaných v prostředí se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> je možné pozorovat zvýšení rychlosti fotosyntézy. Avšak po dlouhodobé kultivaci v podmínkách zvýšené koncentrace oxidu uhličitého velmi často dochází k poklesu rychlosti fotosyntézy, snížení množství nebo aktivity enzymu Rubisco či dalších enzymů Calvinova cyklu. Tento jev je označován jako aklimace. Obecně lze aklimaci na vyšší koncentraci CO<sub>2</sub> definovat jako soubor fyziologických změn, k nimž dochází při dlouhodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. To znamená, že fotosyntetická charakteristika listů, které se vyvinuly v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>, se liší od charakteristiky listů rostlin, které byly v předchozím období kultivovány při okolní koncentraci CO<sub>2</sub>. Nejnápadněji se tato aklimace projevuje postupným poklesem rychlosti čisté fotosyntézy, což bylo mnohokrát pozorováno a popsáno. Například Marek et al. [26] prokázali, že po přechodném vzestupu rychlosti

fotosyntézy dochází po dlouhodobé kultivaci v podmínkách zvýšené koncentrace  $\text{CO}_2$ , k poklesu rychlosti fotosyntézy a obsahu chlorofylů.

Obecně se předpokládá, že pokles rychlosti fotosyntézy při aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$ , je způsoben zpětnovazebným účinkem asimilátů akumulovaných v listu [8].

Další důvody pro aklimaci mohou být, že rostlina není schopna využít nadbytečné asimiláty, proto reguluje pokles aktivity jejich zdrojů, a nebo že pro fotosyntézu při vyšší koncentraci  $\text{CO}_2$  je postačující menší množství Rubisco. Při dvojnásobném zvýšení stávající koncentrace  $\text{CO}_2$  stačí pouhých 65% Rubisco pro zajištění příslušné rychlosti karboxylace [27].

### **2.3.1.2 Rychlost fotorespirace**

Základy fotosyntézy a fotorespirace spočívají ve schopnosti enzymu Rubisco navázat na stejný substrát ribulosa-1,5-bisfosfát jak  $\text{CO}_2$  (karboxylace), tak i  $\text{O}_2$  (oxygenace). Navázáním molekuly na uvedený substrát začíná tzv. glykolátová cesta, během níž se při postupném navázání dvou molekul  $\text{O}_2$  uvolní i molekula  $\text{CO}_2$ .

Vzestup koncentrace  $\text{CO}_2$  ve vzduchu obklopujícím list působí dvojnásobným způsobem. Zvýšení koncentrace substrátu ( $\text{CO}_2$ ) zvyšuje rychlost karboxylace, a tedy i fotosyntézy. Zvyšuje i hodnotu poměru koncentrací  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , a tím snižuje fotorespiraci, tedy ztráty  $\text{CO}_2$ , což vede opět ke zvýšení rychlosti fotosyntézy [8].

### **2.3.1.3 Vodivost průduchů**

Změna koncentrace  $\text{CO}_2$  v atmosféře obklopující list ovlivňuje míru otevřenosti průduchů, která zase modifikuje jejich vodivost. Zatímco mechanismus účinku  $\text{CO}_2$  na fotosyntézu i fotorespiraci je dobře znám, reakce průduchů na změny koncentrace  $\text{CO}_2$  je přes dlouhodobé úsilí mnoha autorů popsána spíše fenomenologicky.

Zvýšení koncentrace  $\text{CO}_2$  vyvolává u většiny rostlin přivření průduchů. Drake et al. [27] zjistili ve 41 pokusech, že při zdvojnásobení atmosférické koncentrace došlo ke snížení vodivosti průduchů. Ale není mnoho dalších prací, v nichž by byl podobný pokles vodivosti průduchů prokázán.

Pokles vodivosti nemusí však vést i k poklesu rychlosti fotosyntézy. Současně se totiž zvyšuje rozdíl koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi atmosférou a místem karboxylace, což fotosyntézu stimuluje.

S poklesem vodivosti průduchů je také spojen pokles rychlosti transpirace, a tím dochází k modifikaci jednotlivých složek energetické bilance listu, což se projeví i ve změně jejich teploty. Například zvýšení koncentrace  $\text{CO}_2$  zvýšilo teplotu porostu bavlníku srstnatého o  $1^\circ\text{C}$ . Idso et al. [28] prokázali, že zvýšení teploty listu je přímo úměrné poklesu vodivosti průduchů.

### **2.3.1.4 Rychlost dýchání**

Rychlost dýchání je ve srovnání s rychlostí fotosyntézy relativně malá. Okamžité ztráty uhlíku dýcháním odpovídají méně než 10 % zisku uhlíku paralelně probíhající fotosyntézou. Přesto je však nutné považovat dýchání za proces významně ovlivňující bilanci uhlíku v rostlině. Dýchání probíhá nejen v noci, kdy je fotosyntéza nulová, ale i ve dne, třebaže rychlosti denního dýchání jsou patrně nižší než rychlosti dýchání v noci.

Při sledování vlivu CO<sub>2</sub> na rychlost mitochondriálního dýchání jej lze rozlišit na přímý a nepřímý. Při přímém vlivu dochází k poklesu rychlosti dýchání při vystavení zvýšené koncentraci oxidu uhličitého. Nepřímý vliv se projevuje při aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. V tomto případě však existují protichůdné údaje popisující jak inhibici, tak i stimulaci dýchání [8].

## 2.3.2 Nepřímé účinky

### 2.3.2.1 Teplota

Změna globálního klimatu je velmi často spojována se změnami teploty. Zvýšením koncentrace CO<sub>2</sub> se zvyšuje teplotní optimum fotosyntézy. To znamená, že relativní pokles rychlosti fotosyntézy při teplotách přesahující teplotní optimum rostlin, je kompenzován právě posunutím tohoto optima [29]. S teplotou také klesá kvantový výtěžek fotosyntézy, tj. počet molů CO<sub>2</sub> fixovaného absorpcí jednoho molu fotonu. Kompenzační ozáření, což je ozáření, při níž je příjem a výdej CO<sub>2</sub> listu v rovnováze, s teplotou naopak silně stoupá. Avšak zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> při vyšších teplotách tuto kompenzační ozáření zase velmi snižuje [30].

Působení změny koncentrace CO<sub>2</sub> při současné změně teploty má v metabolismu rostliny několik styčných bodů. Jednak se mění energetická bilance listu nebo porostu. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> snižuje vodivost průduchů, tím klesá rychlost transpirace a zvyšuje se teplota rostliny. Pokud paralelně dochází ke zvýšení teploty, její účinek je tímto působením CO<sub>2</sub> zesílen, naopak při paralelním poklesu teploty může být její účinek i anulován.

Druhým významným styčným bodem je samotná bilance příjmu a výdeje CO<sub>2</sub> rostlinou. Zvýšení rychlosti fotosyntézy zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> může být zesíleno, pokud dojde současně ke zvýšení teploty, a to v rozmezí mezi teplotním minimem a optimem fotosyntézy. Při vyšších teplotách však další zvýšení teploty vzduchu může i na fotosyntézu působit inhibičně [8].

Dále pak má teplota velmi silný vliv na rychlost dýchání. Se zvýšením teploty klesá poměr rychlosti fotosyntézy k rychlosti dýchání.

### 2.3.2.2 Minerální výživa

Účinek zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na rychlost fotosyntézy ovlivňuje také příjem a obsah minerálních živin v rostlině. A naopak dostupnost minerálních živin ovlivňuje velikost působení zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na fotosyntézu a produkci rostlin.

Hlavní postavení mezi biogenními živinami zaujímá dusík. Je to dáno jednak tím, že se vyskytuje v rostlinách ze všech živin v největším množství, a jednak tím, že je přítomen ve všech bílkovinách, tedy i v enzymech.

Díky nedostatečné dostupnosti N dochází u rostlin pěstovaných při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub> k urychlenému rozkladu enzymů, zejména enzymu Rubisco. Právě v tomto enzymu je obsažena podstatná část veškerého dusíku v listech. Zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> umožňující vyšší rychlost fixace CO<sub>2</sub> bude vyžadovat menší množství enzymu Rubisco, a tak i menší množství dusíku. Účinnost využití dusíku je definována buď jako rychlost fotosyntézy vztažená na obsah N v listech nebo jako množství sušiny rostliny vztažené na její množství. Zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> vede k poklesu obsahu N v listech o 15 až 20 %, což je dáno poklesem obsahu fotosyntetických bílkovin [31].

## 2.4 Metody stanovení aktivity enzymu Rubisco

### 2.4.1 Aktivita

Aktivita enzymu Rubisco vyjadřuje látkové množství asimilovaného oxidu uhličitého za sekundu na jednotkovou plochu listu. Toto je definice nespecifické aktivity a udává se v  $[\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}]$ . Může se vyjádřit i specifická aktivita, což je látkové množství asimilovaného  $\text{CO}_2$  za sekundu na jednotkovou hmotnost enzymu Rubisco. Specifická aktivita je tedy dána jednotkou  $[\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}]$ . Aktivita Rubisco je ve srovnání s ostatními enzymy velmi nízká. Rubisco přemění řádově jednotky molekul substrátu za sekundu, kdežto molekula běžného enzymu zpracuje až tisíce molekul.

### 2.4.2 Stanovení aktivity in vivo

Metody in vivo jsou nepřímé metody. Nejznámější je metoda gazometrická.

#### 2.4.2.1 Gazometrické stanovení

Gazometrická metoda je založena na měření rychlosti spotřeby  $\text{CO}_2$  rostlinami. Měří se pokles koncentrace  $\text{CO}_2$  v okolí rostliny vyvolaný fotosyntetickou fixací molekul  $\text{CO}_2$ . List je umístěn do asimilační komory, která je termostabilní, vzduchotěsná a je zajištěno dokonalé proudění vzduchu. Pokles koncentrace  $\text{CO}_2$  v okolí listu se měří pomocí infračerveného analyzátoru plynů [18].

### 2.4.3 Stanovení aktivity in vitro

Nejpoužívanější metody in vitro, neboli přímé metody, jsou radiometrická a spektrofotometrická.

#### 2.4.3.1 Radiometrické stanovení

Radiometrická metoda je založena na asimilaci molekuly  $^{14}\text{CO}_2$  do molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu. Do reakční směsi, která musí být zbavena veškerého  $\text{CO}_2$  a uhličitánů, se přidá známé množství  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  a reakce se nastartuje známým množstvím extraktu aktivovaného enzymu. Po 60 sekundách se reakce zastaví přidávkem  $\text{HCl}$ , čímž dojde k inaktivaci Rubisco a uvolnění  $^{14}\text{CO}_2$ , které se kvantitativně odstraní. Změří se radioaktivita produktů, které odpovídá množství asimilovaného  $^{14}\text{CO}_2$  [19].

#### 2.4.3.2 Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrické stanovení aktivity Rubisco je založeno na měření změny absorbance při 340 nm, ke které dochází při oxidaci  $\text{NADH}$  v systému spřažených chemických reakcí prvních tří kroků Calvinova cyklu [20]. V reakční směsi jsou obsaženy enzymy a substráty, které 3-fosfoglycerát přemění na glyceraldehyd-3-fosfát. V posledním kroku dochází k oxidaci  $\text{NADH}$ , čímž dojde k poklesu absorbance.

Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu Rubisco současných autorů, vycházejí z metody, kterou publikovali Lilley a Walker [21]. Jejich metoda je praktičtější než radiometrické stanovení, avšak nevýhodou je časová prodleva mezi karboxylační reakcí a oxidací  $\text{NADH}$ . Bylo zjištěno, že tato nežádoucí prodleva může být eliminována přidáním ATP-regenerujícího systému do reakční směsi. Tento regenerační systém představuje fosfokreatin, který odstraňuje hromadící se  $\text{ADP}$  v reakční směsi [21].

Stanovuje se počáteční a celková aktivita. Počáteční aktivita se stanovuje ihned po extrakci a vyjadřuje množství fyziologicky aktivovaného enzymu ve vzorku. Při stanovení celkové aktivity se enzym inkubuje s CO<sub>2</sub> a ionty Mg<sup>2+</sup>. Při inkubaci dojde k aktivaci všech aktivních center, která nejsou blokována pevně vázanými inhibitory. Metoda spektrofotometrického stanovení aktivity enzymu Rubisco je více popsána v kapitole 3.2.2.

Uvádí se, že do supernatantu přejde pouze 33% z celkového množství enzymu Rubisco [22]. Toto je příčina toho, že aktivity měřené in vivo jsou vyšší než aktivity naměřené in vitro.

## 2.5 Metody stanovení množství Rubisco

### 2.5.1 HPLC

HPLC, neboli vysokotlaká kapalinová chromatografie, je druh kapalinové chromatografie, kde oddělení složek analytu je urychleno čerpáním elučního činidla pod velkým tlakem. Toto stanovení je založeno na vzniku slabých vazeb mezi složkami mobilní fáze, obsahující vzorek, a pevnou fází, která tvoří náplň kolony. Jednotlivé složky analyzovaného vzorku jsou k pevné fázi vázány různě velkou silou, která je závislá na fyzikálních či chemických vlastnostech této dvojice.

Při použití HPLC pro stanovení Rubisco se používá gelová kolona, kde dochází k dělení částic podle jejich velikosti [6]. Kolonou nejdříve procházejí velké molekuly a malé molekuly mohou pronikat hlouběji do pórů, proto jsou v koloně zadržovány déle. Metoda HPLC se pro stanovení množství Rubisco používá méně často než ostatní metody.

### 2.5.2 Gelová elektroforéza

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za použití dodecylsírany sodného, neboli SDS-PAGE, je nejpoužívanější metodou při stanovení množství Rubisco. Při metodě SDS-PAGE se dodecylsírany sodný naváže na bílkovinu, narovná její řetězec částečnou denaturací a udělí jí záporný náboj, jehož velikost je úměrná hmotnosti bílkoviny. Na takto vzniklé ionty působí elektrická síla

$$F_E = q \cdot E$$

kde  $q$  je náboj iontu,  $E$  je síla elektrického pole a odporová síla

$$F_t = -3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d \cdot v$$

kde  $\eta$  je viskozita prostředí,  $d$  je průměr částic a  $v$  je rychlost částic.

Výsledkem rovnováhy je určitá rychlost pohybu částic v závislosti na jejich velikosti a tím dochází k separaci jednotlivých bílkovin. Polyakrylamidový gel díky své viskozitě umožňuje rozdělení bílkovin na krátké dráze. Gel se připravuje smícháním monomerů s aktivátory a nalitím mezi elektroforetická skla. Vhodné je nechat analyzovaný vzorek projít vrstvou řidšího (zaostřovacího) gelu, aby došlo k zakoncentrování bílkovin. Na něj pak navazuje separační gel, který je viskóznější a kde dochází k vlastní separaci bílkovinných složek. Separované bílkoviny se poté barví pomocí trifenylmethanového barviva Coomassie blue. Zjištění koncentrace separovaných bílkovin se provádí srovnáním ploch píků s plochou píku standardu [1].

### 2.5.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je podobně jako SDS-PAGE založena na rovnováze odporové a elektrické síly, které působí na elektricky nabitou částici v elektrickém poli. Na složky analyzovaného vzorku také působí elektroosmotický tok, což je neselektivní síla, která unáší ionty směrem ke katodě a třecí síla, která působí proti pohybu částic a její velikost je úměrná velikosti částic. Sílu odporu lze zvýšit použitím elektroforézy v zesíťovaném prostředí, kde je kapilára naplněna gelem nebo častěji je jako separační pufr použit roztok lineárních polymerů [23].

### 2.5.4 Imunologické metody

#### 2.5.4.1 Radioimunsrážecí metoda

Radioimunsrážecí metodu využívá mnoho autorů ke stanovení množství Rubisco. Enzym je aktivován inkubací v přítomnosti iontů  $Mg^{2+}$  a  $HCO_3^-$ , radioaktivně značeného  $^{14}C$  2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu a protilátkového séra se specifickou afinitou k enzymu Rubisco. Vznikne sraženina komplexu Rubisco- $^{14}C$  2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu-protilátka, která je odstraněna filtrací přes polysulfonový filtr a promyta od nadbytku  $^{14}C$  2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Množství Rubisco je přímo úměrné úrovni radiace vyzařované sraženinou. U této metody je nutná kalibrace na standard Rubisco [24].

#### 2.5.4.2 ELISA

ELISA je analytická metoda, která se využívá ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Má řadu variant, ale všechny jsou založeny na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednu z těchto látek je kovalentně vázán enzym, který katalyzuje chemickou přeměnu substrátu v reakční směsi. Produkt enzymové reakce je buď barevný a stanovuje se spektrofotometricky nebo fluoreskuje a stanovuje se fluorimetricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky v analyzovaném vzorku [25].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál

U buku lesního (*Fagus sylvatica*) byl sledován vliv ozáření a vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a množství enzymu Rubisco. Stromky byly kultivovány v atmosférách s normální koncentrací CO<sub>2</sub> (asi 385 μmol mol<sup>-1</sup>, ambient = A) a zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (asi 700 μmol mol<sup>-1</sup>, elevated = E) na Experimentálním pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech.

Vzorky listů byly odebírány ve dvou termínech, a to na jaře 12. 6. 2009 a v létě 3. 9. 2009.

Listy byly z vybraných stromků ustříženy a pomocí korkovrtu byly vyřezány dva disky o jednotné ploše 0,000628 m<sup>2</sup>. Získané disky byly dány do mikroskopu Eppendorf s propíchnutým víčkem a ponořeny do termosky s tekutým dusíkem. Při převozu z experimentálního pracoviště byly vzorky uchovávány v termosce s tekutým dusíkem a poté až do samotné analýzy byly uchovávány v mrazničce při – 20°C.



Obr. 3.1 Kultivační sféry Experimentálního ekologického pracoviště ÚSBE AV ČR na Bílém Kříži. Převzato z [48].

### 3.2 Metody

#### 3.2.1 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco

Stanovení aktivity enzymu Rubisco bylo provedeno metodou Lilleyho a Walkera [10] s extrakcí podle Besforda [11]. Počáteční aktivita byla stanovena podle Heringové [12]. Substrátem probíhající reakce byl ribosa-5-fosfát, který se v reakční směsi transformuje působením enzymů obsažených v extraktu a dodaného ATP na ribulosa-1,5-bisfosfát (reakce I, II). Jako druhý substrát reakce a současně aktivátor Rubisco byl do směsi přidáván KHCO<sub>3</sub>, který uvolňuje CO<sub>2</sub>. K aktivaci Rubisco byly také dodávány ionty Mg<sup>2+</sup> ve formě MgCl<sub>2</sub>. Do reakční směsi byly přidány enzymy NADH a ATP, které katalyzují reakce (III) – (V). Konečným produktem reakce je glycerinaldehyd-3-fosfát (reakce III – V). Hromadění ADP

v reakční směsi inhibuje enzym fosfoglycerátkinasu, proto je fosforylován na ATP v reakci (VI). Aktivita Rubisco byla počítána z úbytku absorbance při oxidaci NADH (V) podle Lambert-Beerova zákona.

- ribosa-5-fosfát  $\xrightarrow{\text{ribosa-5-fosfätisomerasa}}$  ribulosa-5-fosfät I.
- ribulosa-5-fosfät + ATP  $\xrightarrow{\text{ribulosa-5-fosfätkinasa}}$  ribulosa-1,5-bisfosfät + ADP + H<sup>+</sup> II.
- ribulosa-1,5-bisfosfät + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{Rubisco}}$  2(3-fosfoglycerät) + 2H<sup>+</sup> III.
- 3-fosfoglycerät + ATP  $\xrightarrow{\text{fosfoglycerätkinasa}}$  1,3-bisfosfoglycerät + ADP IV.
- 1,3-bisfosfoglycerät + NADH + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{glyceraldehyd-3-fosfätdehydrogenasa}}$  glyceraldehyd-3-fosfät + NAD<sup>+</sup> + HPO<sub>4</sub> V.
- 2-fosfokreatin + 2 ADP  $\xrightarrow{\text{kreatinfosfokinasasa}}$  2-kreatin + 2ATP VI.

### 3.2.1.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO<sup>®</sup> VZ Hradec Králové. Parametry: nejmenší dílek 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML

Centrifuga MLW T52,1

Spektrofotometr

### 3.2.1.2 Chemikálie

3-Fosfoglycerätkinasa; Sigma ALDRICH

ATP – adenosin-5-trifosfät; Sigma ALDRICH

BSA – bovinní sérový albumin; Sigma ALDRICH

DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH

Fosfokreatin; Sigma ALDRICH

Glyceraldehyd-3-fosfätdehydrogenasa; Sigma ALDRICH

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonová kyselina; Sigma ALDRICH

Hydrogenuhličitan draselný; Sigma ALDRICH

Hydroxid draselný; Penta

Kreatinfosfokinasasa; Sigma ALDRICH

Chlorid hořečnatý; Sigma ALDRICH

Na<sub>2</sub>EDTA – ethylendiamintetraoctan disodný; Sigma ALDRICH

NADH – β-nikotinamidadeninukleotid; Sigma ALDRICH

Polyvinylpolypyrrolidon

R5P – ribosa-5-fosfät; Sigma ALDRICH

### 3.2.1.3 Příprava roztoků

#### Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8

5,96 g HEPES a 0,186 g Na<sub>2</sub>EDTA bylo rozpuštěno ve 400 ml vody a pH bylo upraveno pomocí 3M KOH na 7,8. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok se používá pro přípravu extrakčního roztoku. Je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě.

#### ***Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0***

5,96 g HEPES a 0,219 g Na<sub>2</sub>EDTA bylo rozpuštěno ve 400 ml vody a pH bylo upraveno pomocí 3M KOH na 8,0. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok se používá pro přípravu pracovního a aktivačních roztoků. Je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě.

#### ***Extrakční roztok***

V odměrné baňce o objemu 200 ml bylo v zásobním roztok HEPES-KOH, pH 7,8 rozpuštěno 0,156g DTT, 0,096 g MgCl<sub>2</sub> a 0,4 g BSA.

Připravený extrakční roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,2% BSA.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

#### ***Aktivační roztoky***

V odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 0,2285 g MgCl<sub>2</sub> v HEPES-KOH, pH 8,0.

V odměrné baňce o objemu 50 ml bylo rozpuštěno 0,3003 g KHCO<sub>3</sub> v HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě.

#### ***Roztok glycerinaldehyd-3-fosátdehydrogenasy***

6 mg enzymu glycerinaldehyd-3-fosátdehydrogenasy bylo rozpuštěno v 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

#### ***Roztok kreatinfosfokinasy***

2 mg enzymu kreatinfosfokinasy byly rozpuštěny v 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

#### ***Roztok R5P***

6,2 mg R5P bylo rozpuštěno v 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

#### ***Roztok 2-fosfoglycerátkinasy***

Byl použit komerčně vyráběný roztok Sigma ALDRICH.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

#### ***Pracovní roztok***

V odměrné baňce o objemu 25 ml bylo v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 rozpuštěno: 0,0475 g ATP

0,005 g NADH

0,0325 g fosfokreatinu  
0,02 g DTT  
47,5  $\mu$ l 3-fosfoglycerátkinasy  
250  $\mu$ l roztoku glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy  
250  $\mu$ l roztoku kreatinfosfokinasy.

Připravený pracovní roztok obsahoval po přidání 50  $\mu$ l aktivačních roztoků 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 20 mM  $MgCl_2$ , 25 mM  $KHCO_3$ , 3,5 mM ATP, 0,25 mM NADH, 5 mM fosfokreatinu, 1 mM  $Na_2EDTA$ , 5 mM DTT, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy a 80 nkat kreatinfosfokinasy.

Pracovní roztok se uchovává při laboratorní teplotě a je stálý maximálně 6 hodin.

#### **3.2.1.4 Extrakce enzymu**

Dva disky listu byly rozdrceny v třecí misce s mořským pískem. Bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku a polyvinylpyrrolidon. Vzorek byl přibližně 30 sekund homogenizován. Supenze byla přelita do centrifugační zkumavky a asi 1 minutu odstředována při 3000 otáčkách/min. U získaného extraktu obsahujícího enzym byla měřena počáteční a celková aktivita. Bylo nutné pracovat co nejrychleji, jelikož extrakt rychle stárne.

#### **3.2.1.5 Měření aktivity**

##### **Počáteční aktivita**

Pro měření počáteční aktivity bylo do 1 ml optické kyvety napipetováno 50  $\mu$ l aktivačního roztoku  $MgCl_2$ , 50  $\mu$ l aktivačního roztoku  $KHCO_3$ , 20  $\mu$ l extraktu, 850  $\mu$ l pracovního roztoku a 30  $\mu$ l roztoku R5P. Roztok byl promíchán a ihned byl měřen pokles absorbance při vlnové délce 340 nm v 30 s intervalech.

##### **Celková aktivita**

Pro měření celkové aktivity bylo do 1 ml optické kyvety napipetováno 50  $\mu$ l aktivačního roztoku  $MgCl_2$ , 50  $\mu$ l aktivačního roztoku  $KHCO_3$  a 20  $\mu$ l extraktu. Roztok byl promíchán a inkubován po dobu 15 minut. Poté bylo do kyvety přidáno 850  $\mu$ l pracovního roztoku a 30  $\mu$ l roztoku R5P. Po promíchání byl měřen pokles absorbance při vlnové délce 340 nm v 30 s intervalech.

#### **3.2.1.6 Výpočet aktivity**

Celkem bylo u každého odběru měřeno 10 vzorků ( $n = 10$ ), z toho každý vzorek byl měřen po dobu 5 minut a 30 sekund. U každého vzorku bylo získáno celkem dvanáct hodnot absorbance  $A$ . Z těchto hodnot byl vypočítán úbytek absorbance za 30 sekund  $\Delta A$ .

př.  $\Delta A = A_1 - A_2 = 0,6720 - 0,6700 = 0,0020$

Tabulka 1: Měření počáteční aktivity ve vzorku A1 – stín

t [s]	plocha [m2]	A	ΔA
0	0,000628	0,6720	0,0000*
30	0,000628	0,6700	0,0020*
60	0,000628	0,6670	0,0030
90	0,000628	0,6630	0,0040
120	0,000628	0,6600	0,0030
150	0,000628	0,6560	0,0040
180	0,000628	0,6530	0,0030
210	0,000628	0,6490	0,0040
240	0,000628	0,6460	0,0030
270	0,000628	0,6420	0,0040
300	0,000628	0,6380	0,0040
330	0,000628	0,6350	0,0030
Průměr ΔA			0,0035
Aktivita [ $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ]			3,6860

\*vyřazené chybné hodnoty z důvodu projevu tzv. lag fáze

Po vyřazení chybných hodnot byla ze změn absorbance vypočítána aktivita enzymu Rubisco z Lambert-Beerova zákona:

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \varepsilon \cdot l \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

kde A je absorbance, t je čas [s],  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $\text{cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$ ], l je délka optické dráhy [cm] a c je koncentrace vzorku [ $\text{mol dm}^{-3}$ ].

Aktivita enzymu byla vypočítána z rychlosti úbytku substrátu  $\text{CO}_2$ :

$$\Delta n = \frac{\Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l}$$

kde  $\Delta A$  je průměrný úbytek absorbance po vyřazení chybných hodnot [ $\text{min}^{-1}$ ], V je objem vzorku [ $\mu\text{l}$ ],  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $\text{cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$ ] a l je délka optické dráhy [cm]. Hodnota  $\varepsilon$  je pro NADH je  $6300 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$  a délka optické kyvety je 1 cm.

Aktivita v 1000  $\mu\text{l}$  extraktu:

$$\Delta n = \frac{\Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l} = \frac{0,007 \cdot 1000}{2 \cdot 6300 \cdot 60} = 9,23 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Aktivita v celém objemu extraktu (5 ml):

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 9,23 \cdot 10^{-6}}{0,02} = 0,002325 \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Aktivita enzymu vztažená na jednotkovou plochu:

$$\Delta n = \frac{0,002325}{0,000628} = \underline{\underline{3,6860 \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}}}$$

### 3.2.1.7 Výpočet specifické aktivity

Specifická aktivita je aktivita vztažená na 1 g enzymu Rubisco. Byla vypočítána jako podíl aktivity enzymu Rubisco a obsahu enzymu Rubisco.

Př. Výpočet pro počáteční aktivitu A slunce:

$$A_{\text{sp}} = \frac{\Delta n_{(\text{A slunce})}}{c_{(\text{A slunce})}} = \frac{3,7306}{7,1730} = 0,5201 \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$$

## 3.2.2 Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco

Stanovení vycházelo z metod Damervalové [13] a Rogerse et al. [22] a metoda byla dále upravena Floriánem [6].

### 3.2.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO<sup>®</sup> VZ Hradec Králové. Parametry: nejmenší dílek 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML

Centrifuga MLW T52,1

Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga (Lotyšsko)

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 od firmy BIO-RAD (USA)

### 3.2.2.2 Chemikálie

2-Merkaptoethanol; Sigma ALDRICH

Akrylamid; SERVA

Brilantní modř G 250 – Coomasie; SERVA

Bromfenolová modř Na sůl; SERVA

Butanol; Lachema

D-ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa – standard Rubisco; Sigma ALDRICH

DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH

Ethanol; Lachema

Glycerol; Sigma ALDRICH

Glycin; SERVA

Kyselina chlorovodíková; Penta

Methanol CHROMASOLV, Seidel-de-Haën

N,N'-Methylenbisakrylamid; SERVA

Peroxodisíran amonný; SERVA

Octová kyselina; Lachema

SDS – dodesylsulfát sodný; Sigma ALDRICH

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin; SERVA  
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma ALDRICH

### **3.2.2.3 Příprava roztoků**

#### ***Roztoky pro přípravu gelů***

*Roztok A:* 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno ve 100 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok B:* 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 8,8. Poté byl roztok doplněn na 100 ml.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok C:* 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 6,8. Poté byl roztok doplněn na 100 ml.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok D:* 10 g SDS bylo rozpuštěno ve 100 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok E:* 0,1 g peroxidisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1 ml vody.

Roztok je nutno připravit pro každé stanovení čerstvým.

*Roztok F:* 10 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 1 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*TEMED:* Komerčně dodávaný roztok.

#### ***Pomocné roztoky***

*Elektrodový pufr:* 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu bylo rozpuštěno v 1000 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a používá se opakovaně.

*TRIS pufr:* 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,02 g DTT a 50 ml glycerolu bylo rozpuštěno ve 450 ml vody, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na 6,8.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

*Vzorkový pufr:* 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptoethanolu.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

#### ***Roztoky pro vizualizaci bílkovin***

*Stabilizační roztok:* 100 ml methanolu se smíchá se 400 ml vody.

*Barvicí roztok:* 0,5 g Coomassie Blue R 250 se smíchá se 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.

*Odbarvovací roztok:* 250 ml methanolu se smíchá se 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

### **3.2.2.4 Příprava gelů**

Elektroforetická skla byla omyta vodou, odmaštěna, opláchnuta destilovanou vodou a před upevněním do stojanu byla vyleštěna buničinou namočenou v ethanolu. Skla byla upevněna do stojanu tak, že menší sklo bylo vepředu, spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem shora byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byl použit 10% separační a 5% zaostřovací gel. Při přípravě gelů bylo nutné kvůli vysoké toxicitě akrylamidu pracovat v rukavicích.

### **10% separační gel**

Pomocí automatických pipet byly do kádinky odměřeny objemy roztoků podle tabulky 1.

*Tabulka 2. Objemy roztoků k přípravě separačního gelu (10 ml)*

<b>Roztok</b>	<b>Objem [ml]</b>
Destilovaná voda	4,00
A	3,30
B	2,50
C	---
D	0,10
E	0,14
TEMED	0,004

Před nalitím roztoku mezi elektroforetická skla byl přidán roztok E a roztok TEMED. Poté byl roztok dobře promíchán nalit mezi skla asi 2 cm od horního okraje. Zbýlý roztok byl ponechán v kádince jako kontrola ztuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl převrstven butanolem pro vyrovnání hladiny a jako ochrana proti vypařování vody.

### **5% zaostřovací gel**

Pomocí automatických pipet byly do kádinky odměřeny objemy roztoků podle tabulky 2.

*Tabulka 3. Objemy roztoků k přípravě zaostřovacího gelu (3 ml)*

<b>Roztok</b>	<b>Objem [ml]</b>
Destilovaná voda	2,10
A	1,00
B	---
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po ztuhnutí separačního gelu byl odstraněn butanol a gel byl několikrát vymyt destilovanou vodou. Po přidání roztoku E a roztoku TEMED byl zaostřovací gel dobře promíchán a nalit na vrstvu separačního gelu téměř po okraj. Zbýlý roztok byl ponechán v kádince jako kontrola ztuhnutí gelu. Do prostoru mezi skla byl nasazen elektroforetický hřebínek, který byl odstraněn až před nanášením vzorků. Hotový gel bylo možné uchovávat v lednici, ale nejdéle do příštího dne.

#### **3.2.2.5 Příprava vzorků**

Dva disky listu byly rozdrceny ve třecí misce s mořským pískem. Byly přidány 2 ml TRIS pufru a vzorek byl asi 30 sekund homogenizován. Vzniklá suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 1 minutu odstředována při 3000 otáčkách/min. 0,5 ml extraktu

bylo napipetováno do mikrozkuhavky Eppendorf, bylo přidáno 0,5 ml vzorkového pufru a směs byla po promíchání na vortexu 5 minut vařena v termobloku. Po vychlazení byly vzorky uchovávány v mrazničce při teplotě -18°C.

### **3.2.2.6 Elektroforéza**

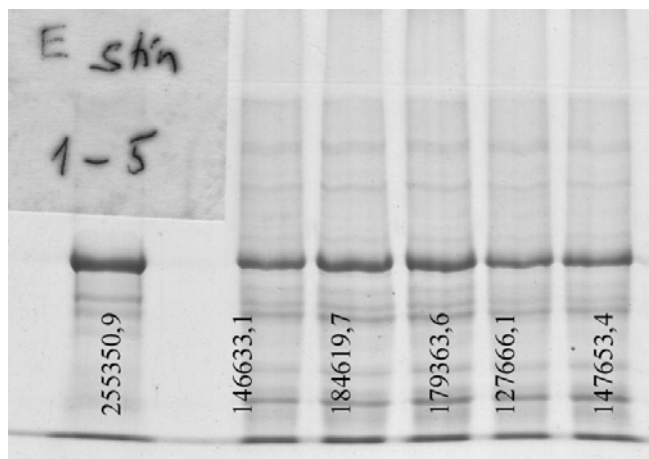
Sklo s připraveným gelem bylo vytaženo ze stojanu, očištěno od zbytků gelu a byl opatrně odstraněn elektroforetický hřebínek. Skla byla upevněna do stojanu pro elektroforézu menším sklem směrem dovnitř. Stojan byl vložen do elektroforetické nádoby a vnitřní prostor byl až po okraj zaplněn elektrodoým pufrem. Vnější prostor byl zaplněn asi do poloviny nádoby. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do první jamky napipetováno 10 µl standardu Rubisco (1,000 mg v 1 ml vzorkovacího pufru) a do každé další pozice 10 µl vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji o konstantním napětí 140 V. V průběhu analýzy bylo nutné kontrolovat, zda elektrodoý pufr neprotéká z vnitřní části stojanu do vnější a popřípadě ho bylo nutné doplnit. Elektroforéza probíhala, dokud čelo vzorku nedostoupilo asi 2 cm od spodního okraje gelu.

### **3.2.2.7 Zviditelnění bílkovin**

Po ukončení elektroforézy byla skla s gelem vyjmuta ze stojanu a ponořena do misky s destilovanou vodou menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle byla skla od sebe oddělena a otočením spodního skla pod vodou došlo k vyklopení gelu. Destilovaná voda byla vylita, gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Stabilizační roztok byl slit do zásobní láhve a gel byl protřepáván s barvicím roztokem po dobu 30 minut. Poté byl gel promyt použitým odbarvovacím roztokem a následně 90 minut protřepáván s čistým odbarvovacím roztokem do dostatečného odbarvení. Po vylití použitého roztoku byl gel opět promyt destilovanou vodou, položen na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie, která zabraňuje vysychání. S gelem bylo nutné pracovat v rukavicích z důvodu vysoké toxicity akrylamidu. Hotové gely byly uchovávány v lednici při teplotě 8°C.

### **3.2.2.8 Vyhodnocení**

Hotové gely byly skenovány a velké podjednotky byly zanalyzovány programem *AIDA* (*Advanced Image Data Analyzer, verze 3.23.001, Raytest, Germany*). Tímto programem byly zóny velkých podjednotek Rubisco převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Koncentrace Rubisco ve vzorku byla vypočítána porovnáním plochy zóny vzorku a plochy zóny standardu. Jelikož je poměr velikosti plochy a koncentrace ovlivněn mnoha faktory, byl standard Rubisco nanesen na každý gel.



Obr. 3.2 Naskenovaný gel po analýze programem AIDA.

### 3.2.2.9 Výpočet množství

Tabulka 4. Výpočet množství Rubisco

Vzorek	plocha [m <sup>2</sup> ]	plocha zóny
standard		174555,7
A1 slunce	0,000628	204495,1
A2 slunce	0,000628	199657,8
A3 slunce	0,000628	210426,1
A4 slunce	0,000628	153851,2*
A5 slunce	0,000628	194027,8

\* odlehlá hodnota, nebyla zahrnuta do výpočtu

Obsahu enzymu v 1 ml extraktu:

$$c = \frac{\text{standard}}{\varphi \text{ vzorek}} \cdot c(\text{standardu}) = \frac{174555,7}{202151,5} \cdot 1 = 1,1581 \text{ mg ml}^{-1} \rightarrow 2x \text{ zředěný roztok}$$

Nezředěný roztok:

$$m = 1,1581 \cdot 2 = 2,3162 \text{ mg v 1 ml}$$

Přepočet na celý objem extraktu:

$$2 \cdot 2,3162 = 4,6324 \text{ mg ve 2 ml}$$

Množství Rubisco přepočítané na jednotkovou plochu listu:

$$c = \frac{4,6324}{0,000628} = \underline{\underline{7,376 \text{ g m}^{-2}}}$$

## 4 Výsledky a diskuse

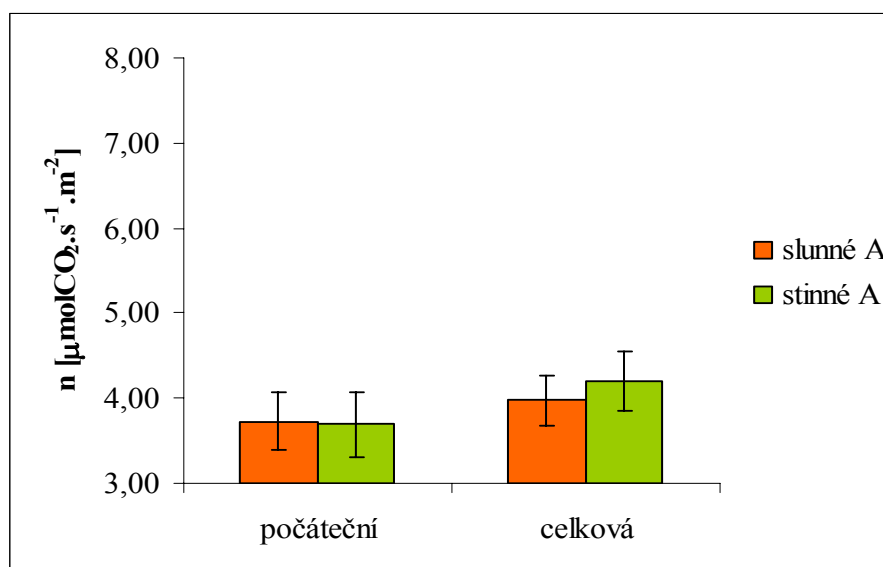
### 4.1 Výsledky

#### 4.1.1 Aktivita enzymu Rubisco

Pomocí metody uvedené v kapitole 4.1 byla měřena počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco. Vzorky potřebné pro toto stanovení byly odebírány ve dvou ročních obdobích, a to na jaře 12. 6. 2008 a v létě 3. 9. 2008. Při každém odběru bylo získáno 40 vzorků. Z toho 10 vzorků bylo ze stinných listů a 10 ze slunných listů při normální koncentraci (A). Při zvýšené koncentraci (E) bylo opět odebráno 10 vzorků ze stinných listů a 10 ze slunných. Z každých 10 vzorků byla získána průměrná hodnota ( $n = 10$ ).

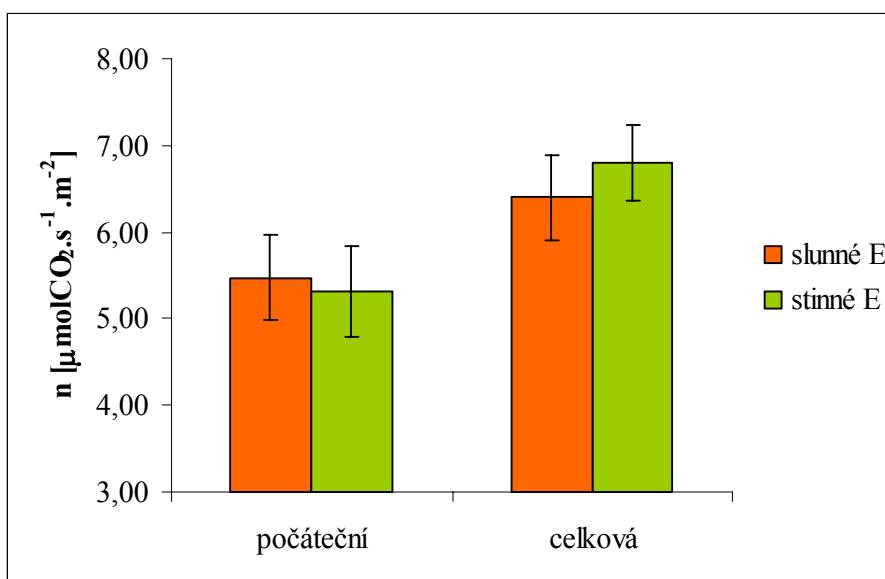
Tabulka 5. Hodnoty počáteční a celkové aktivity u vzorků odebíraných 12. 6. 2008

Vzorek	Počáteční aktivita [ $\mu\text{molCO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ]	Celková aktivita [ $\mu\text{molCO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ]
A slunce	3,73	3,98
A stín	3,69	4,20
E slunce	5,47	6,40
E stín	5,31	6,80



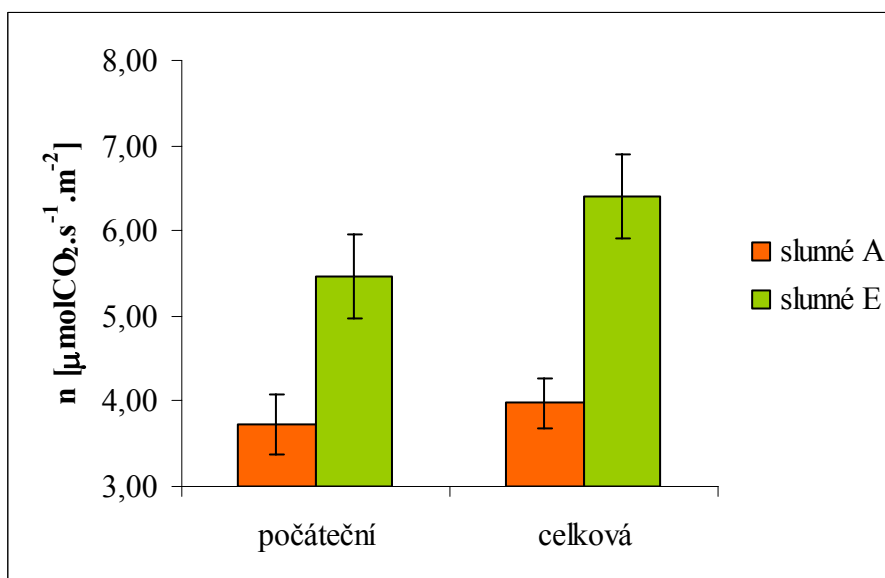
Obr. 4.1 Počáteční a celková aktivita u slunných a stinných listů A ze dne 12. 6. 2008.

Z obrázku 4.1 je zřejmé, že počáteční aktivita enzymu Rubisco byla dne 12. 6. 2008 jak u slunných, tak i stinných listů téměř totožná. Celková aktivita u stinných listů byla poněkud vyšší než u listů slunných, avšak rozdíl nebyl statisticky významný.

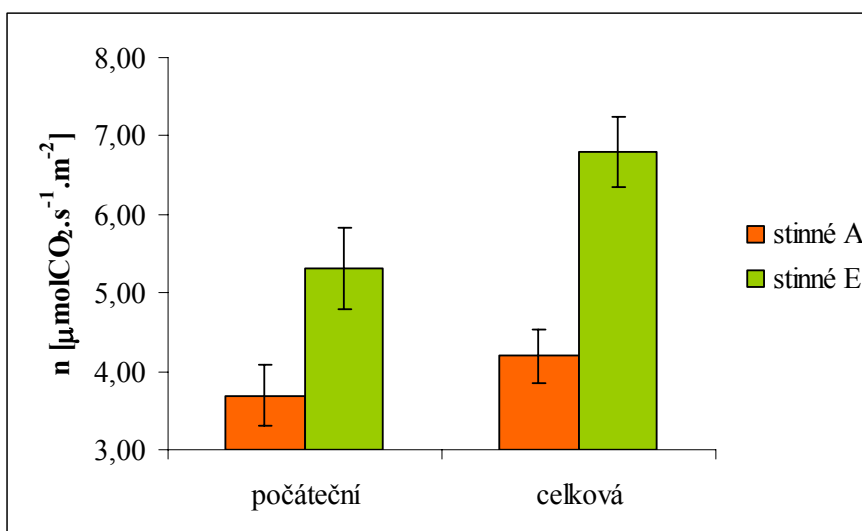


Obr. 4.2 Počáteční a celková aktivita u slunných a stinných listů E ze dne 12. 6. 2008.

Na obrázku 4.2 je vidět, že počáteční aktivita enzymu Rubisco u stinných listů byla dne 12. 6. 2008 nižší než u slunných, ale celková aktivita Rubisco byla naopak u stinných listů vyšší než u slunných. Rozdíly v aktivitě mezi slunnými a stinnými listy však nebyly statisticky významné.



Obr. 4.3 Srovnání počáteční a celkové aktivity u slunných vzorků A a E ze dne 12. 6. 2008.

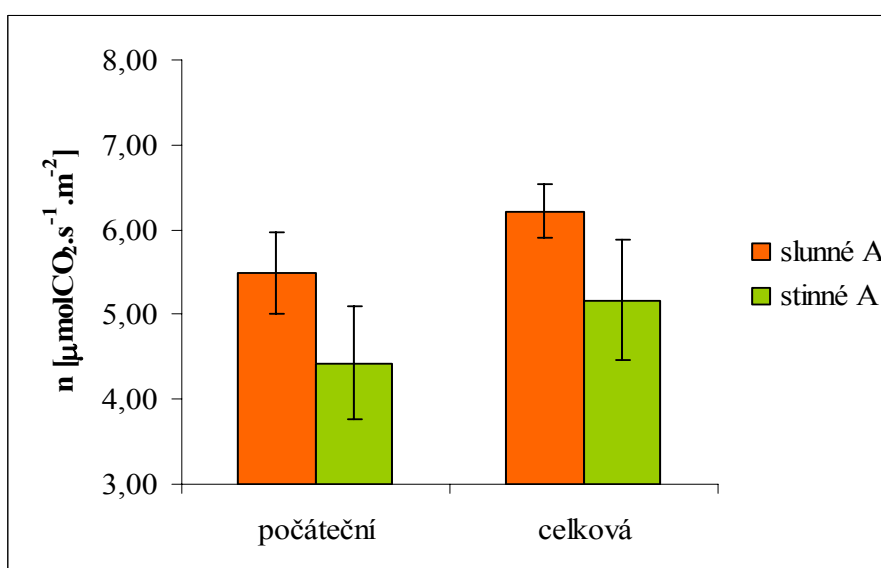


Obr. 4.4 Srovnání počáteční a celkové aktivity u stinných vzorků A a E ze dne 12. 6. 2008.

Z obrázků 4.3 a 4.4 je patrné, že u slunných a stinných listů kultivovaných při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> byla počáteční i celková aktivita dne 12. 6. 2008 statisticky významně vyšší než u slunných a stinných listů A, a to o 32 % u počáteční aktivity slunných listů a 38 % u celkové aktivity slunných listů. U stinných listů E je počáteční aktivita o 31 % vyšší než u listů A a celková aktivita je u listů E o 38 % vyšší než u listů A.

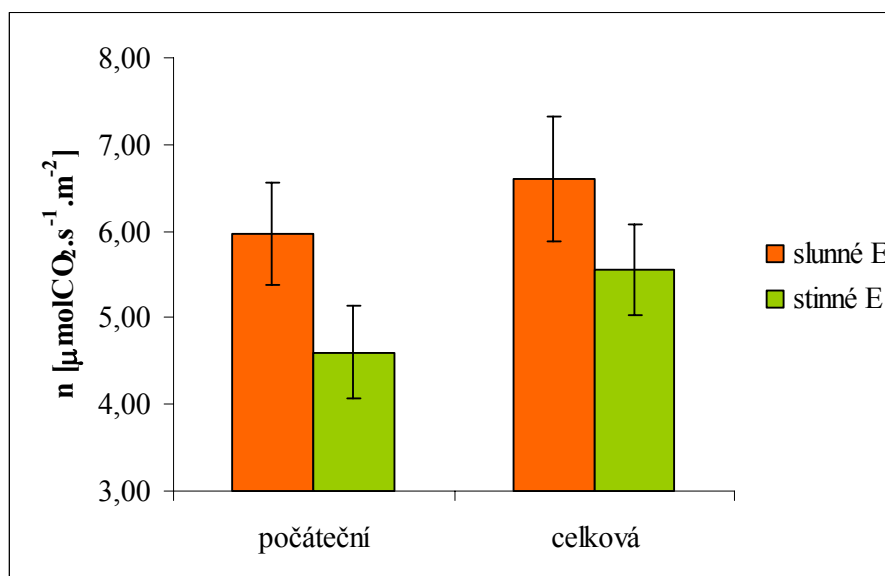
Tabulka 6. Hodnoty počáteční a celkové aktivity u vzorků odebíraných 3. 9. 2008

Vzorek	Počáteční aktivita [ $\mu\text{molCO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ]	Celková aktivita [ $\mu\text{molCO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ]
A slunce	5,49	6,22
A stín	4,42	5,17
E slunce	5,97	6,61
E stín	4,60	5,56



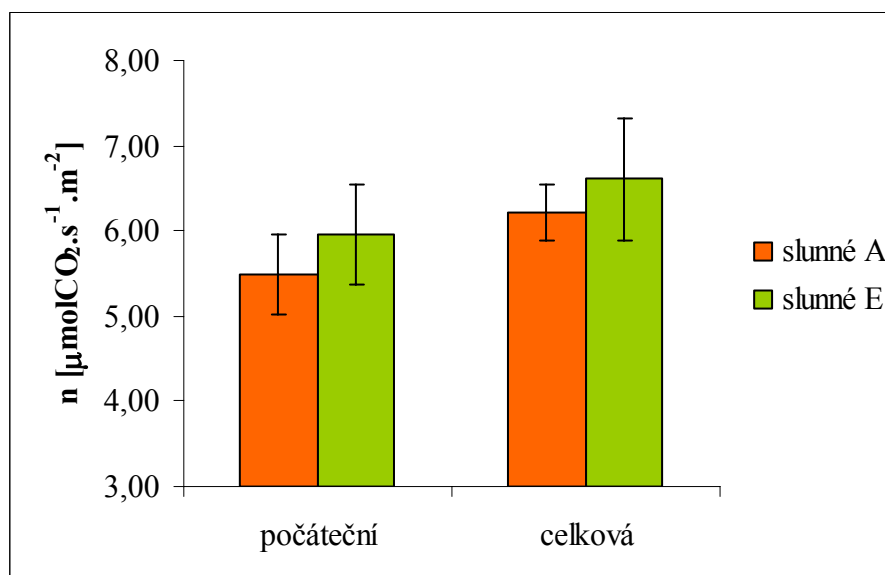
Obr. 4.5 Počáteční a celková aktivita u slunných a stinných listů A ze dne 3. 9. 2008.

Z obrázku 4.5 lze vyčíst, že počáteční i celková aktivita enzymu Rubisco u slunných listů byla dne 3. 9. 2008 vyšší než u stinných listů. Zatímco počáteční aktivita u slunných listů nebyla statisticky významně odlišná od aktivity Rubisco u stinných listů, celková aktivita Rubisco statisticky významně odlišná byla. Celková aktivita Rubisco u slunných listů byla o 17 % vyšší než u stinných listů..

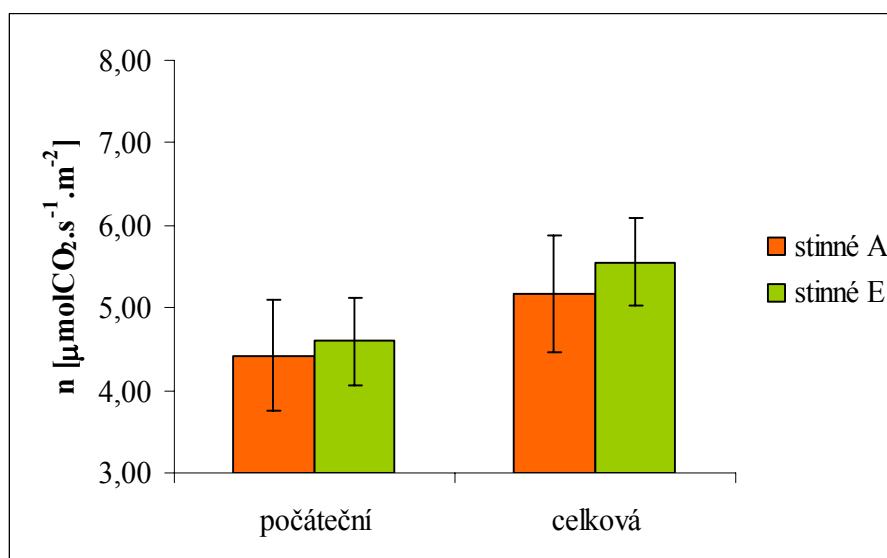


Obr. 4.6 Počáteční a celková aktivita u slunných a stinných listů E ze dne 3. 9. 2008.

Obrázek 4.6 ukazuje, že aktivita enzymu Rubisco u slunných listů kultivovaných při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> byla 3. 9. 2008 vyšší než u stinných listů, a to o 23 %. Statisticky významné byly rozdíly v počáteční aktivitě avšak nikoliv v celkové aktivitě Rubisco.



Obr. 4.7 Srovnání počáteční a celkové aktivity u slunných vzorků A a E ze dne 3. 9. 2008.



Obr. 4.8 Srovnání počáteční a celkové aktivity u stinných vzorků A a E ze dne 3. 9. 2008.

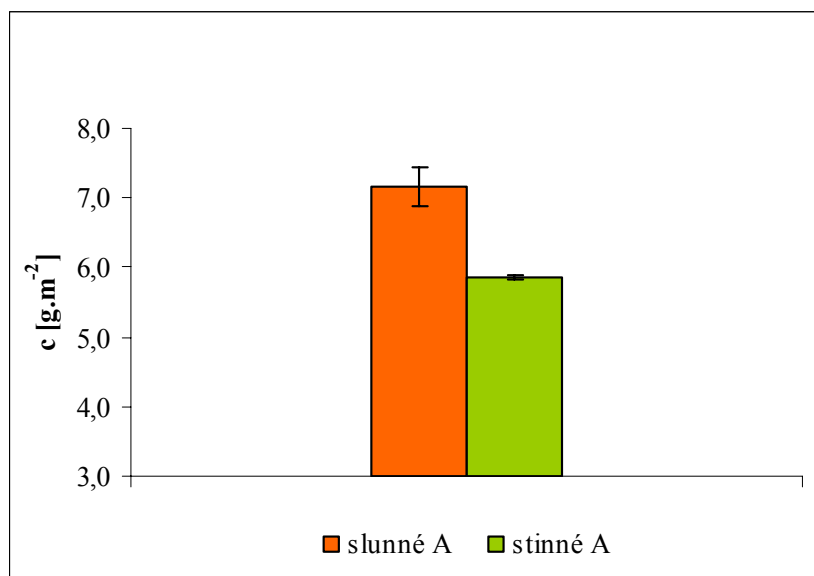
Na obrázcích 4.7 a 4.8 je srovnání počáteční a celkové aktivity Rubisco u slunných i stinných listů kultivovaných při normální a zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. Hodnoty počátečních aktivit Rubisco u slunných i stinných listů A byly 3. 9. 2008 nižší než hodnoty u E, rozdíly však nebyly statisticky významné.

#### 4.1.2 Obsah enzymu Rubisco

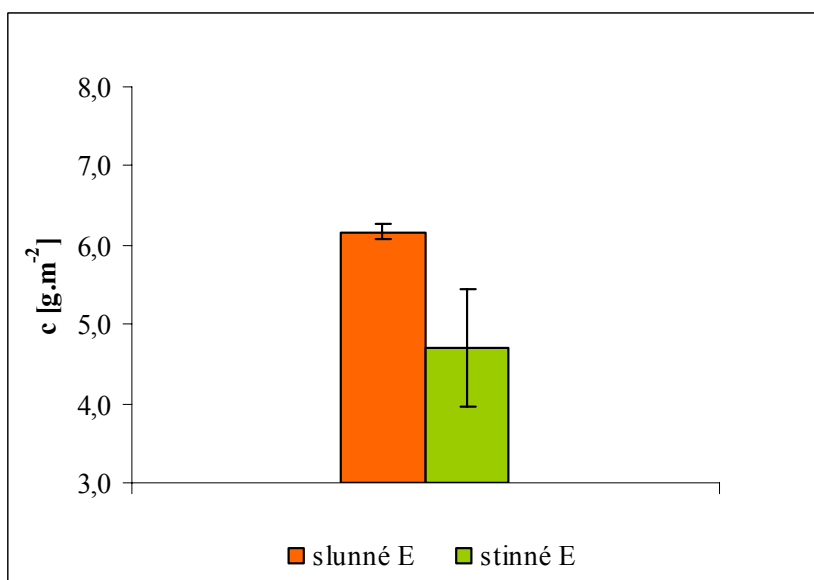
Elektroforeticky byl stanoven obsah enzymu Rubisco u slunných a stinných listů kultivovaných při normální a zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. Vzorky byly odebírány současně se vzorky pro stanovení aktivity Rubisco. Ke každému datu bylo odebráno 40 vzorků. Z toho 10 vzorků bylo ze stinných listů a 10 ze slunných listů při normální koncentraci (A). Při zvýšené koncentraci (E) bylo opět odebráno 10 vzorků ze stinných listů a 10 ze slunných. Z každých 10 vzorků byly získány průměrné hodnoty (n = 10).

Tabulka 7. Hodnoty množství enzymu Rubisco u vzorků odebíraných 12. 6. 2008

Vzorek	c [g m <sup>-2</sup> ]
A slunce	7,2
A stín	5,9
E slunce	6,2
E stín	4,7

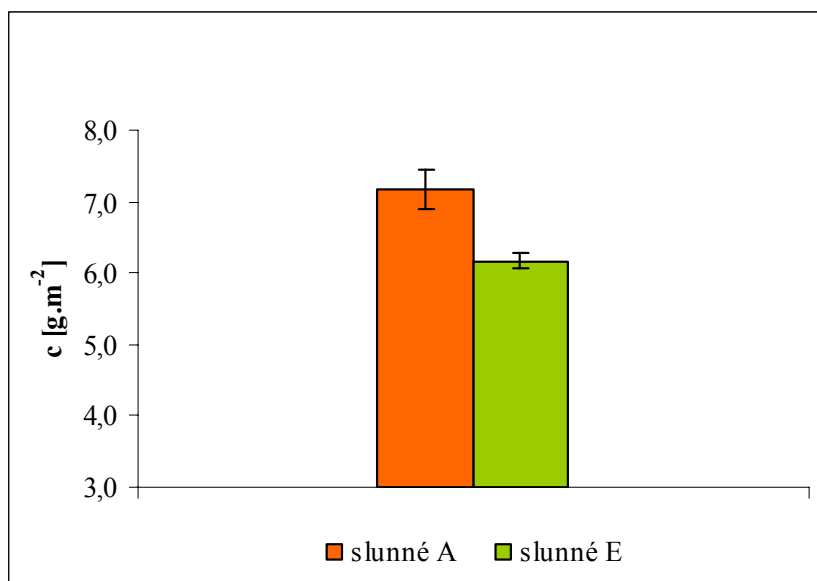


Obr. 4.9 Srovnání obsahu Rubisco u slunných a stinných listů A ze dne 12. 6. 2008.

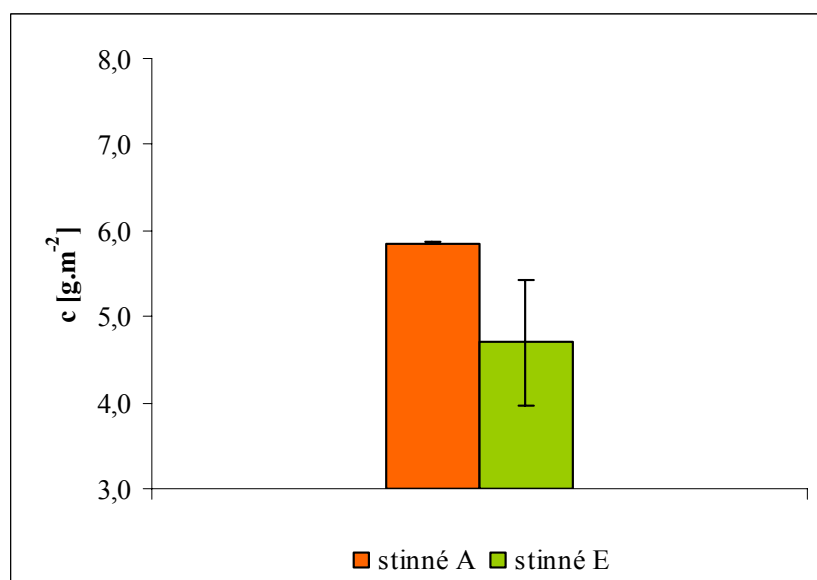


Obr. 4.10 Srovnání množství Rubisco u slunných a stinných listů E ze dne 12. 6. 2008.

Z obrázků 4.9 a 4.10 je zřejmé, že obsah enzymu Rubisco byl ve stinných listech kultivovaných při normální i zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  dne 12. 6. 2008 statisticky významně nižší, a to o 18 % u listů A a o 24 % u listů E.



Obr. 4.11 Srovnání obsahu Rubisco u slunných listů A a E ze dne 12. 6. 2008.

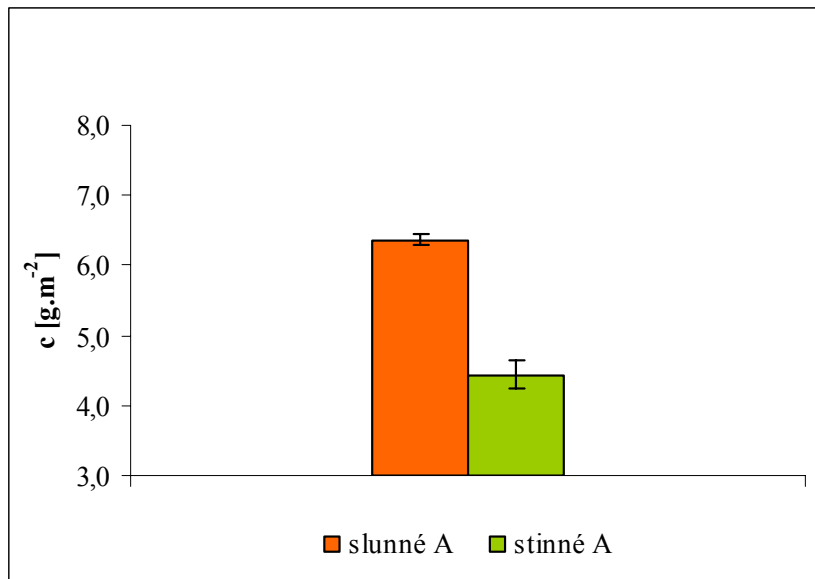


Obr. 4.12 Srovnání obsahu Rubisco u stinných listů A a E ze dne 12. 6. 2008.

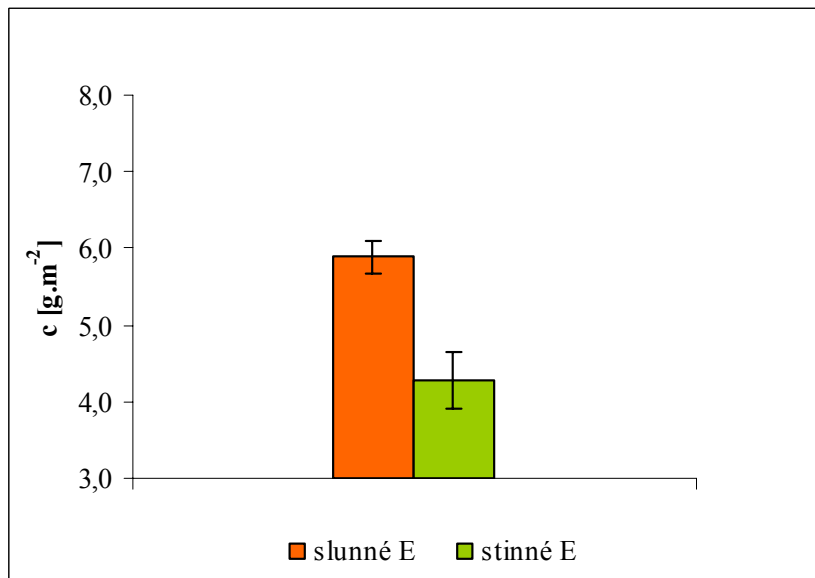
Na obrázcích 4.11 a 4.12 je vidět, že obsah Rubisco 12. 6. 2008 byl ve slunných a stinných listech A statisticky významně vyšší než ve slunných a stinných listech E, a to o 14 % u slunných listů a o 20 % u stinných listů.

Tabulka 8. Hodnoty obsahu enzymu Rubisco u vzorků odebíraných 3. 9. 2008

Vzorek	c [g m <sup>-2</sup> ]
A slunce	6,4
A stín	4,4
E slunce	5,9
E stín	4,3

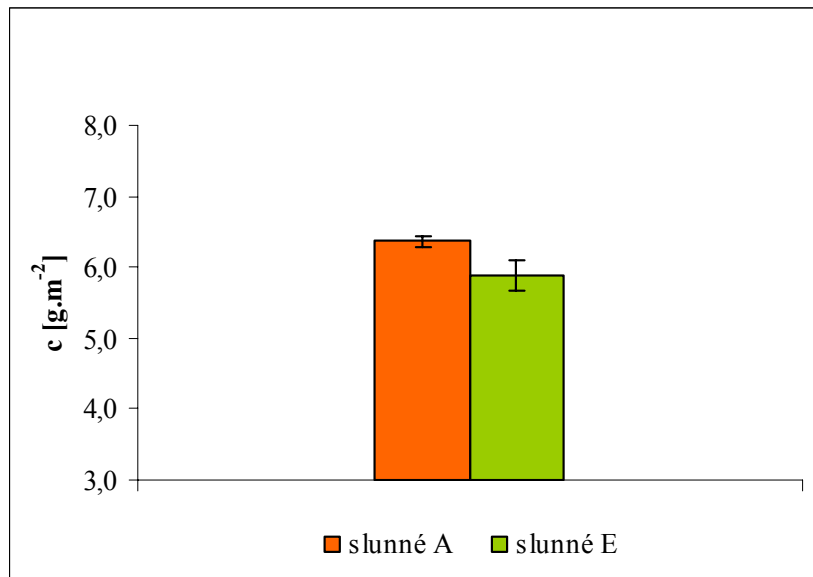


Obr. 4.13 Srovnání obsahu Rubisco u slunných a stinných listů A ze dne 3. 9. 2008.

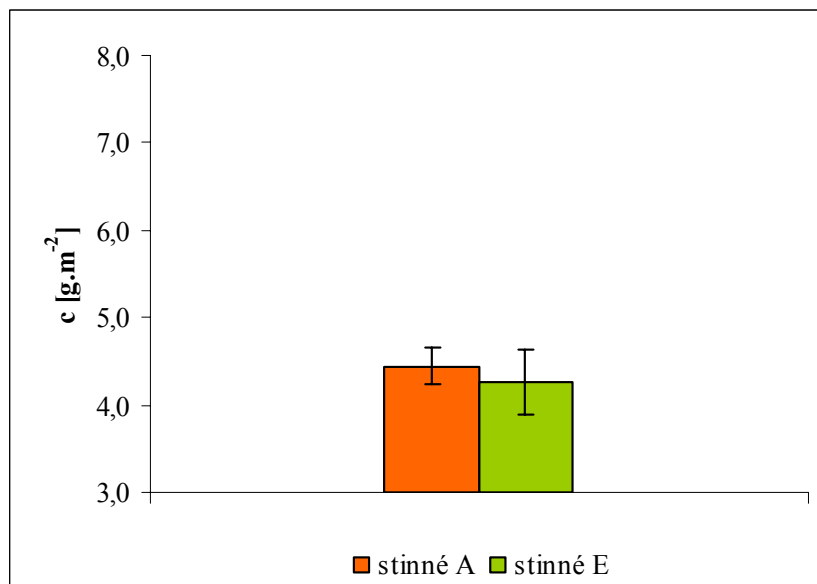


Obr. 4.14 Srovnání obsahu Rubisco u slunných a stinných listů E ze dne 3. 9. 2008.

Z obrázků 4.13 a 4.14 je zjevné, že obsah enzymu Rubisco byl ve stinných listech, kultivovaných jak při normální koncentraci  $\text{CO}_2$ , tak i při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  statisticky významně nižší, a to o 31 % u listů A a o 27 % u listů E, než u slunných listů, kultivovaných za stejných podmínek.

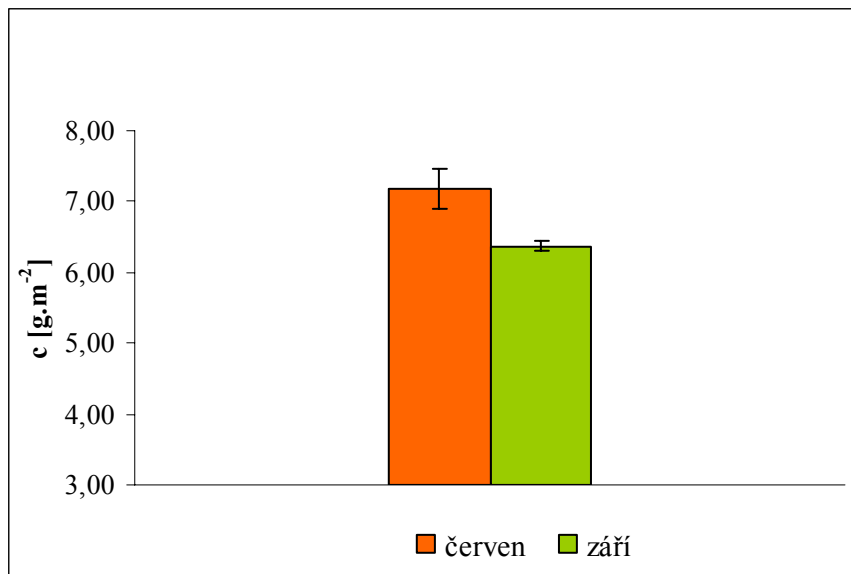


Obr. 4.15 Srovnání obsahu Rubisco u slunných listů A a E ze dne 3. 9. 2008.

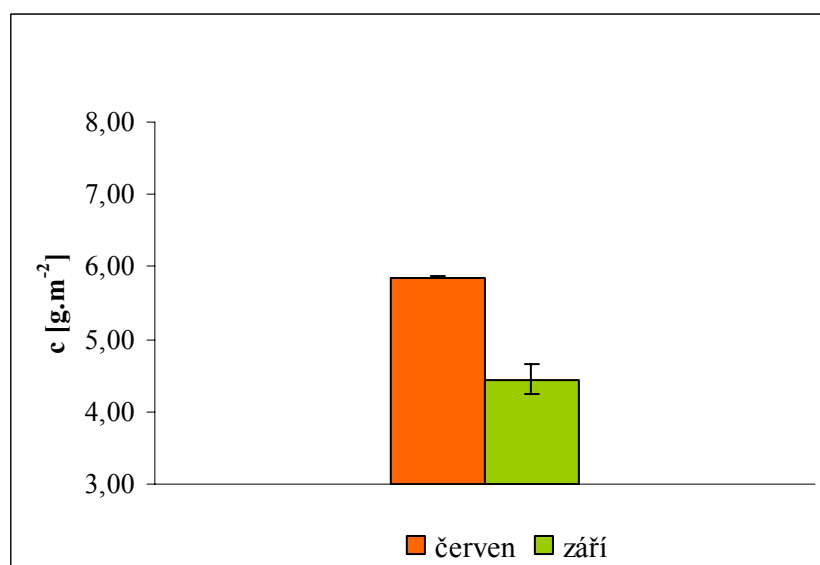


Obr. 4.16 Srovnání obsahu Rubisco u stinných listů A a E ze dne 3. 9. 2008.

Na obrázcích 4.15 a 4.16 je patrné, že obsah Rubisco u slunných a stinných listů E byl nižší než u slunných a stinných listů A. Obsah u slunných listů E byl o 8 % nižší než u slunných listů A. Zatímco u slunných listů E byl tento rozdíl statisticky významný u stinných listů nikoliv.

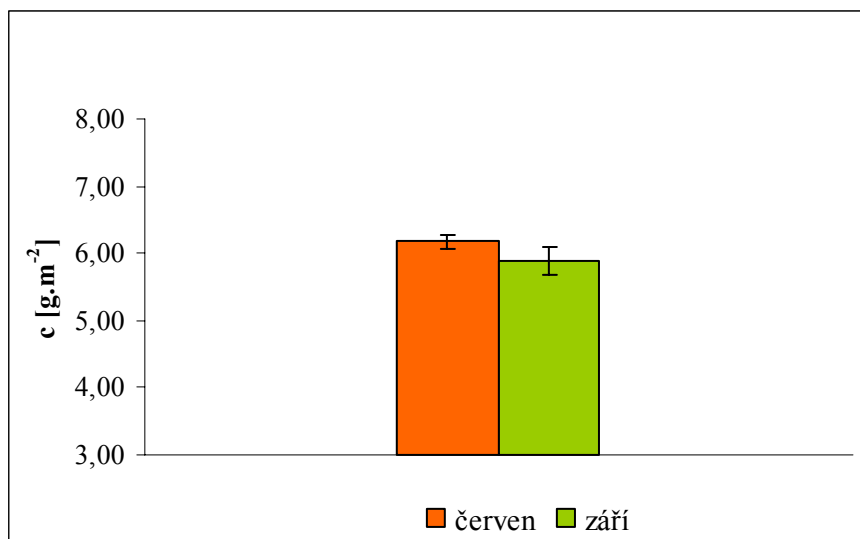


Obr. 4.17 Srovnání obsahu enzymu Rubisco u slunných listů A v červnu 12. 6. 2008 a září 3. 9. 2008.

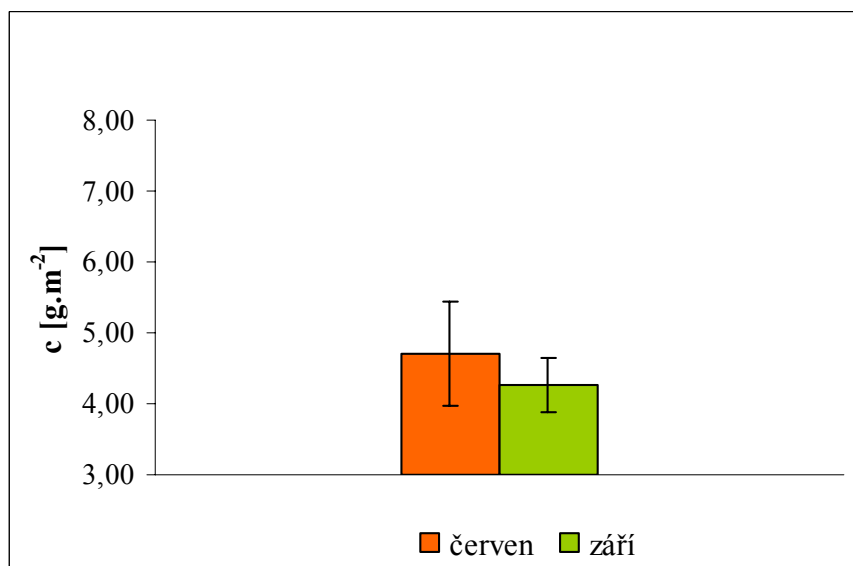


Obr. 4.18 Srovnání obsahu enzymu Rubisco u stinných listů A v červnu 12. 6. 2008 a září 3. 9. 2008.

Na obrázcích 4.17 a 4.18 je vidět, že obsah enzymu Rubisco byl u slunných i stinných listů A v červnu 12. 6. 2008 statisticky významně vyšší než v září 3. 9. 2008. Obsah u slunných listů byl v červnu o 11 % vyšší než v září a u stinných listů o 25 %.



Obr. 4.19 Srovnání obsahu enzymu Rubisco u slunných listů E v červnu 12. 6. 2008 a září 3. 9. 2008.



Obr. 4.20 Srovnání obsahu enzymu Rubisco u stinných listů E v červnu 12. 6. 2008 a září 3. 9. 2008.

Z obrázků 4.19 a 4.20 je zřejmé, že obsah enzymu Rubisco byl u slunných i stinných listů E v červnu 12. 6. 2008 vyšší než v září 3. 9. 2008, ale tento rozdíl byl statisticky nevýznamný.

## 4.2 Diskuze

Experimentů sledujících vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na polní plodiny v jejich přirozených podmínkách je velmi mnoho, avšak obdobné údaje pro lesní porosty donedávna chyběly. Teprve s technickým rozvojem nejrůznějších typů komor, zvláště pak zavedení systému FACE, se tato situace změnila. Specifickým problémem při studiu vlivu změny klimatu na růst a produkci stromů je právě jejich délka života, která vyžaduje i adekvátně dlouhé doby měření. Jestliže pro byliny představuje několikaměsíční měření pokus dlouhodobého charakteru, protože postihuje jejich celou dobu vegetace, tak pro většinu stromů by odpovídající pokus musel trvat desetiletí. Je vhodné uvést i další aspekt stromů. Malé až zdánlivě zanedbatelné změny vnějších podmínek mohou vést zejména ve stádiu mladých rostlin k nepostřehnutelným změnám morfologie nebo fyziologie stromů. Další vývoj však může tyto změny natolik zesílit, že se objeví překvapivé důsledky, jejichž původ se jen těžko zjišťuje [8].

Stromy nepředstavují homogenní skupinu rostlin. Nejčastější členění je na stromy opadavé a stromy stále zelené (jehličnaté), které mají zcela odlišný roční průběh fotosyntézy, rozdílný obsah dusíku v pletivech ap. [43]. Většina prací zaměřených na studium vlivu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na dřeviny je prováděna u jehličnatých stromů a obvykle jsou víceletou záležitostí.

V naší práci jsme zjistili, že obsah Rubisco v listech A byl statisticky významně vyšší (o 14 % v červnu a o 8 % v září) než v listech E. Podle našich měření tedy existuje aklimační deprese obsahu Rubisco na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého, která je významně větší v červnu než v září. Podobné výsledky uvádí většina autorů např. Riikonen et al. [33] u břízy bělokoré (*Betula pendula*), Tissue et al. [36] u borovice těžké (*Pinus ponderosa*) a Zachová [44] u buku lesního (*Fagus sylvatica*). Podle Drake et al. [27] je průměrné snížení obsahu enzymu Rubisco o 15 %.

Co se týče vlivu expozice na obsah enzymu Rubisco, neexistují v literatuře pro listnaté ani jehličnaté stromy žádné dostupné údaje. Podle našich měření byl obsah Rubisco ve slunných listech statisticky významně vyšší než ve stinných listech.

Obsah enzymu Rubisco byl v červnu vyšší než v září, což je v souladu s údaji v literatuře, podle kterých je obsah enzymu Rubisco maximální v době plné expanze listů a potom v průběhu sezóny postupně klesá [45].

Podle našich měření byla aktivita Rubisco v červnu u listů E statisticky významně vyšší než u listů A. Naproti tomu aktivita Rubisco v září u listů E nebyla statisticky významně vyšší, než u listů A. Tyto výsledky jsou v souladu se závěry Zachové [44], pro buk lesní na témže stanovišti, Besforda et al. [47] pro *Prunus avium* a Rogerse a Ellswortha [22] pro *Pinus taeda*. Naproti tomu Riikonen et al. [33] uvádějí u břízy bělokoré pokles celkové aktivity v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> o 14–26 %. Obdobně [37, 38, 36, 46] uvádějí u druhů rodu *Pinus* pokles celkové aktivity Rubisco u mladých jehlic v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>. Podle Drake et al. [27] je průměrné snížení aktivity enzymu Rubisco o 15 a 24 %.

Ve studii Tissuea et al. [38] bylo pozorováno, že obsah a celková aktivita enzymu Rubisco významně rostly s přídatkem N a významně klesaly se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>. Podobné poklesy obsahu Rubisco byly pozorovány i pro mnoho dalších rostlin např. Rowland-Bemford et al. [39], Sage et al. [40]. Naproti tomu, některé rostliny nevykazovaly změnu v obsahu

Rubisco [14], [40]. Snížení celkové aktivity vlivem zvýšené koncentrace oxidu uhličitého je také typické pro hodně rostlin, např. pro rýži [39], rajčata [41] nebo sóju [42].

Snížení obsahu Rubisco může být důsledkem: (1) Represe exprese genů pro Rubisco v důsledku nadměrného hromadění asimilátů (zejména glukosy a sacharosy) v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> [16]. (2) Nedostatečným přísunem dusíku [34].

Kromě toho může zvýšená koncentrace oxidu uhličitého změnit alokaci dusíku ve stromech kvůli přizpůsobení energetickým výdajům. V tom případě je méně dusíku lokalizováno ve fotosyntetickém aparátu, kdežto více dusíku je v kořenovém systému [35].

Podle našich měření se zdá, že obsah a aktivita Rubisco jsou do jisté míry antiparalelní. Výrazný červnový pokles obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace oxidu uhličitého byl doprovázen vysokou aktivitou, a to jak u slunných tak u stinných jehlic. Přitom aktivace Rubisco u E byla nižší než u A. Nárůst aktivity Rubisco u listů E je tedy nutno přičíst vytěsnění denních inhibitorů z aktivních míst enzymu.

## 5 Závěr

Cílem diplomové práce bylo srovnat aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního (*Fagus sylvatica*) v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco, popř. popsat její průběh.

Vzorky listů byly odebírány na Experimentálním ekologickém pracovišti AV ČR Bílý kříž v Moravskoslezských Beskydech, kde jsou stromky buku lesního kultivovány v atmosféře s normální koncentrací oxidu uhličitého (koncentrace CO<sub>2</sub> asi 385 μmol mol<sup>-1</sup>, ambient = A) a v atmosféře se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (asi 700 μmol·mol<sup>-1</sup>, elevated = E). Odběr vzorků se uskutečnil ve dvou odlišných obdobích, a to na konci jara 12. 6. 2008 a na konci léta 3. 9. 2008.

U vzorků byla spektrofotometricky stanovena aktivita enzymu Rubisco podle Lilleyho a Walkera [10] s extrakcí podle Besforda [11]. Pro stanovení počáteční aktivity Rubisco byla metoda modifikována Heringovou [12]. Obsah Rubisco byl stanoven metodou SDS-PAGE podle Damervalové [13], Rogerse et al. [22] a Floriána [6].

Bylo zjištěno, že expozice listů (slunné/stinné) v červnu neměla významný vliv na aktivitu Rubisco. Naproti tomu v září byla u stinných listů naměřena nižší aktivita Rubisco než u listů slunných a tyto rozdíly byly na hranici statistické významnosti.

Listy kultivované při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého měly v červnu asi o 45 % vyšší aktivitu než listy A. Naproti tomu v září nebyly v aktivitě listů A a E statisticky významné rozdíly. Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého tedy stimulovala aktivitu Rubisco nejvíce v první polovině vegetační sezóny.

Obsah enzymu Rubisco byl statisticky významně nižší v E než v A, což svědčí o existenci aklimační deprese na úrovni obsahu Rubisco (s výjimkou stinných listů v září). Rovněž vliv expozice na obsah Rubisco byl významný, obsah Rubisco ve stinných listech byl statisticky významně nižší než v listech slunných. Kromě toho bylo prokázáno, že obsah enzymu Rubisco byl v červnu vyšší než v září.

## 6 Literatura

- [1] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie. 2.*, opravené vyd. (dotisk) Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0438-6.
- [2] VOET, D., VOETOVÁ, J.G. *Biochemie*. Praha:Victoria Publishing, 1990.
- [3] KODÍČEK, M. Biochemické pojmy [online], Vydavatelství VŠCHT, Praha 2004 [cit. 2009-02-05]. Dostupné z:  
<[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/figures/chloroplast.01.jpg](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/figures/chloroplast.01.jpg)>.
- [4] Světelná reakce fotosyntézy [online], Katedra biochemie University Palackého v Olomouci, [cit. 2009-02-15]. Dostupné z:  
<<http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bch/08.ppt>>.
- [5] Metabolismus sacharidů. Dostupné z:  
<[www.ceskolipska.cz/files/11/metsach\\_www.doc](http://www.ceskolipska.cz/files/11/metsach_www.doc)>.
- [6] FLORIÁN, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenazy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Diplomová práce VUT, Brno 2006.
- [7] GLOSER, J. *Fyziologie rostlin* [online], Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 1998, poslední revize 29.5.2003, [cit. 2009-03-11]. Dostupné z:  
<[http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/part\\_02.pdf](http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/part_02.pdf)>.
- [8] NÁTR, L. *Koncentrace CO<sub>2</sub> a rostliny*. ISV Nakladatelství, Praha 2000. ISBN 80-85866-62-5.
- [9] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Dostupné z:  
<[csmres.jmu.edu/biology/Biology/rubisco.gif](http://csmres.jmu.edu/biology/Biology/rubisco.gif)>.
- [10] LILLEY, R.M., WALKER, D.A. An improved spectrophotometric assay for ribulose carboxylase. *Biochem Biophys. Acta*, 1997, **358**: 226-229.
- [11] BESFORD, R.T. Some properties of Ribulose bisfosphate carboxylase extracted from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1984, roč. 35, č. 153, s. 495-504.
- [12] HERINGOVÁ, P. *Aktivita enzymu Rubisco u smrku ztepilého v průběhu dne*. Diplomová práce VUT, Brno 2004.
- [13] DAMERVAL, C., VIENNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT H. Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis*, 1986, **7**: 52-54.
- [14] CAMPBELL, W.J., ALLEN, L.H., BOWES, G. Effects of CO<sub>2</sub> concentration on Rubisco activity, amount, and photosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiology* 1988, **88**: 1310-1316.
- [15] ŠETLÍK, I., SEIDLOVÁ, F., ŠANTRŮČEK I. *Fyziologie rostlin* [online], Biologická fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích, [cit. 2009-03-26]. Dostupné z:  
<<http://www.bf.jcu.cz/structure/katedry/kfyziologie/pre/06.pdf>>.
- [16] LEEGOOD, R.C., SHARKEY, T.D., VON CAEMMERER, S. *Photosynthesis: Physiology and metabolism*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht 2000. ISBN 0-7923-6143-1.
- [17] Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy [online]. Dostupné z:  
<<http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/fotosynteza.htm>>.
- [18] ŠESTÁK, Z., ČATSKÝ, D.T., JARVIS, P. *Plant photosynthetic production. Manual of methods*. Dr. W. Junk, Publishing, The Hague 1971.

- [19] REID, C. D., TISSUE, D. T., FISKUS, E. L. and STRAIN, B. R. Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. *Physiol. Plant.*, 1997, **101**: 398-404.
- [20] PETRŮ E., *Závislost aktivity a množství enzymu Rubisco na ozáření*. Diplomová práce VUT, Brno 2005.
- [21] LORIMER, G.H., BADGER, M.R., ANDREWS, T.J. The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry*, 1976, **15**: 529-536.
- [22] ROGERS, A., ELLSWORTH, D.S., HUMPHRIES, S.W. Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated PCO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 2001, **52**: 1555-1561.
- [23] KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*, 1997, **91**: 320-329.
- [24] KOBZA, J., SEEMANN, J. R. Mechanism for the light regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **85**: 3815-3819
- [25] KODÍČEK, M. *Biochemické postupy* [online], Vydavatelství VŠCHT, Praha, 2004 [cit.2009-03-19]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid/es-002/ebook.obsah.htm>.
- [26] MAREK, M. V., ŠPRTOVÁ M., KALINA J.: The photosynthetic irradiance-response of Norway spruce exposed to a long-term elevation of CO<sub>2</sub> concentration. *Photosynthetica*, 1997, **33**: 259-268.
- [27] DRAKE, B. G., GONZALES-MELER, M. A., LONG, S. P.: More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub> ? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, **48**: 609 - 639.
- [28] IDSO, S. B., KIMBALL, B. A., AKIN, D. E., KRIDLER, J.: A general relationship between CO<sub>2</sub>-induced reductions in stomatal conductance and concomitant increases in foliage temperature. *Environ.exp. Bot.*, 1993, **33**: 443 – 446.
- [29] ACOCK, B., ACOCK, M. C., PASTERNAK, D.: Interactions of CO<sub>2</sub> enrichment and temperature on carbohydrate production and accumulation in muskmelon leaves. *J.Amer.Soc.Hort. Sci.*, 1990, **115**: 525 – 529.
- [30] MORISON, J. I. L., LAWLOR, D. W.: Interactions between increasing CO<sub>2</sub> concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell Environment*, 1999, **22**: V tisku.
- [31] LUO, Y., FIELD, C. B., MOONEY, H. A.: Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated [CO<sub>2</sub>] and interactions among carbon, nitrogen, and growth. *Plant, Cell Environment*, 1994, **17**: 1195 – 1204.
- [32] Calvinův cyklus a pentosafosfátová dráha [online], Katedra biochemie University Palackého v Olomouci, poslední revize 6. 11. 2006, [cit. 2009-02-29]. Dostupné z: <http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bch/09.ppt>.
- [33] RIIKONEN J., HOLOPAINEN, T., OKSANEN, E., VAPAAVUORI, E. Leaf photosynthetic characteristics of silver birch during three years of exposure to elevated concentrations of CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> in the field. *Tree Physiology*, 2005, **25**: 621-632.

- [34] STITT, H., KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ*, 1999, **22**: 583-621.
- [35] COTRUFO, M.F., INESON, P., SCOTT, A. Elevated CO<sub>2</sub> reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biol*, 1998, **4**: 43-45.
- [36] TISSUE, D.T., GRIFFIN, K.L., BALL, J.T. Photosynthetic adjustment in field-grown ponderosa pine trees after si years of exposure to elevated CO<sub>2</sub>. *Tree Physiology*, 1999, **19**: 221-228.
- [37] TURNBULL, M.H., TISSUE, D.T., GRIFFIN, K.L., ROGERS, G.N.D., WHITHEAD, D. Photosynthetic acclimation in *Pinus radiata* D. Don. is related to age of needles. *Plant, Cell and Environment*, 1998, **21**: 1019-1028.
- [38] TISSUE, D.T., THOMAS, R.B., STRAIN, R.B. Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and nutrients on photosynthesis and rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant, Cell and Environment*, 1993, **16**: 859-865.
- [39] ROWLAND-BAMFORD, A.J., BAKER, J.T., ALLEN, L.H. BOWES, G. Acclimation of rice to changing atmospheric carbon dioxide concentration. *Plant, Cell and Environment*, 1991, **14**: 577-583.
- [40] SAGE, R.F., SHARKEY, T.D., SEEMANN, J.R. Acclimation of photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub> in five C<sub>3</sub> species. *Plant Physiology*, 1989, **89**: 590-596.
- [41] YELLE, S., BEESON, R.C. Jr, TRUDEL, M.J., GOSSELIN, A. Acclimation of two tomato species to high atmospheric CO<sub>2</sub>. I. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiology*, 1989, **90**: 1437-1477.
- [42] VU, J.C.V., ALLEN, L.H. Jr, BOWES, G. Drought stress and elevated CO<sub>2</sub> effects on soybean ribulose bisphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rates. *Plant Physiology*, 1987, **83**: 573-578.
- [43] EAMUS, D. Euophysiological traits of deciduous and evergreen woody species in the seasonally dry tropics. *Tree*, 1999, **14**: 11-16.
- [44] ZACHOVÁ, L. *Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na množství a aktivitu enzymu Rubisco*. Diplomová práce VUT, Brno 2008.
- [45] MAKINO, A., HARADA, M., SATO, T., NAKANO, H., MAE, T. Growth and N allocation in rice plants under CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Physiology*, 1997, **115**: 199-203.
- [46] MYERS, D. A., THOMAS, R.B., DE LUCIA, E.H. Photosynthetic capacity of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) trees during the first year of carbon dioxide enrichment in a forest ecosystem. *Plant, Cell and Environment*, 1999, **22**: 473-481.
- [47] BESFORD, R.T., MOUSSEAU, M., MATTEUCCI, G. Biochemistry, physiology and biophysics of photosynthesis. In: Jaris, P.G. (ed) *European Forests and Global Change*. The likely Impacts of Rising CO<sub>2</sub> and Temperature, pp. 29-78. Cambridge University Press, Cambridge 1998.
- [48] Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR. Dostupné z: [http://www.usbe.cas.cz/lefr/img/galerie/kultivacni\\_sfery/sfery\\_2.jpg](http://www.usbe.cas.cz/lefr/img/galerie/kultivacni_sfery/sfery_2.jpg).

## 7 Seznam symbolů

AIDA	Advanced Image Data Analyser
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACE	Free Air CO <sub>2</sub> Enrichment
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IR	infračervená oblast
NADH	nikotinamidadenidinukleotid
NADPH	nikotinamidadenidinukleotidfosfát
Na <sub>2</sub> EDTA	ethylendiamintetraoctan disodný
Pi	anorganický fosfát
P <sub>I,II</sub>	fotosystém I, II
RNA	ribonukleová kyselina
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
R5P	ribosa-5-fosfát
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za užití SDS
TEMED	N,N,N' N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan