

Fyziologie rostlin

Učební text k přednášce Bi4060 na přírodovědecké fakultě MU v Brně.
Určeno pouze ke studijním účelům. Autor textu Jan Gloser.

1. ČÁST - TRANSPORTNÍ PROCESY

Předkové dnešních rostlin žijící v pravěkých mořích postupně získali velmi dobrou funkční výbavu k fotoautotrofnímu způsobu života, ovšem k pobytu mimo vodní prostředí to zdaleka nepostačovalo. Jejich další vývoj, vrcholící úspěšnou kolonizací všech kontinentů, byl záležitostí neobyčejně složitou a dlouhodobou. V první řadě bylo potřeba získat dostatečnou schopnost vzdorovat stále hrozícímu nedostatku vody: buď tolerovat její velkou ztrátu v buňkách a obnovovat veškeré funkce i po téměř úplném vyschnutí, nebo umět lépe s nedostatkovou vodou hospodařit. To znamenalo především osvojit si způsob jejího získávání v hlubších vrstvách půdy specializovanými orgány, rychle ji přivádět do nadzemních částí, a účinně omezit její ztráty. Nemenší problémy měly první terestrické rostliny i se získáváním minerálních živin. Difuze jakožto převažující transportní mechanismus u vodních rostlin nebyl zdaleka schopen zabezpečit potřeby nových obyvatel souše. Postupné strukturní změny umožňující dálkový transport vody a rozpuštěných látek cévními svazky, syntéza nových materiálů zvyšujících mechanickou pevnost a odolnost rozměrnějších těl (lignin a některé další sekundární metabolity), či dokonalá regulace výměny plynů pomocí kutikuly a průduchů na povrchu listů - to všechno mělo obrovský dopad na zrychlení a dlouhodobou aktivitu fotosyntetických procesů a s nimi spojenou rychlost růstu.

Transportní procesy u cévnatých rostlin jsou překvapivě komplikovanější než u živočichů. Množství transportovaných látek (zejména vody a CO_2) je u rostlin neobyčejně velké, a jejich výměny s okolím jsou uskutečňovány současně ve dvou zcela odlišných typech prostředí (půda – atmosféra). U rostlin je na rychlém vnitřním transportu roztoků závislé i šíření regulačních signálů, neboť ty jsou převážně chemické, nikoli elektrické povahy. Přitom rostliny nemají k dispozici žádnou mechanickou „pumpu“, která by uváděla transportované látky do pohybu. To vše je dobrým důvodem k tomu, abychom se seznámili alespoň se základními principy, na kterých je založena jednak výměna látek mezi rostlinou a jejím okolím, a také mezibuněčné a meziorgánové přesuny životně důležitých sloučenin.

Co se transportuje ?

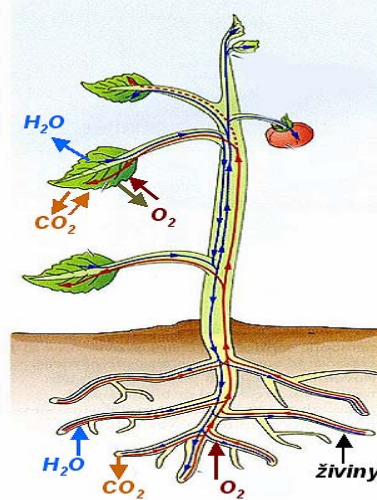
- voda
- plyny (zejména oxid uhličitý a kyslík)
- minerální živiny
- organické látky (vlastní metabolity)

Jakými cestami ?

- buněčnými stěnami
- intercelulárami
- transportními proteiny v membránách
- plasmodesmaty
- lýkem
- xylémem

Jakými mechanismy ?

- difusí (hlavně všechny plyny)
- aktivním transportem (uvnitř buněk a přes membrány)
- hromadným tokem (dálkový transport v lýku a xylému)



Příjem a transport vody

Voda je základní složkou všech živých rostlin, nutnou pro udržení jejich struktury i funkcí. Naprostá většina transportních procesů v rostlinách se odehrává ve vodných roztocích, stejně tak všechny biochemické reakce. Voda v těle rostlin není dlouhodobě zadržována, ale neustále odchází ve formě vodní páry do atmosféry. Za průměrného letního dne dosahuje množství přijaté a opět vydané vody několikanásobku celkového obsahu vody ve všech orgánech. Suchozemské rostliny jsou totiž obvykle vystaveny silně "výparným" podmínkám, tedy vzduchu se značným deficitem vodní páry. Přitom nemohou mít povrch svých orgánů neprodyšně uzavřený, neboť potřebují přijímat ze vzduchu životně důležitý oxid uhličitý. Schopnost tolerovat větší ztráty vody má jen poměrně malá skupina *poikilohydrických* rostlin (např. lišejníky a některé mechy). Naprostá většina ostatních (které se označují jako *homoiohydrické*) musí stále udržovat obsah vody v pletivech na vysokých hodnotách. Již při ztrátě asi poloviny z celkového obsahu vody (při plném nasycení) jsou tyto rostliny nevratně poškozeny a hynou. Proto také zabezpečení rychlého příjmu a transportu vody i regulace jejího výdeje patří mezi prioritní fyziologické funkce rostlin.

Chemický potenciál vody - základní vztahy

Správné pochopení podstaty a průběhu transportních procesů v rostlinách je možné pouze tehdy, máme-li alespoň základní znalosti o energetice fyzikálně-chemických soustav a o obecných vlastnostech roztoků. Tato problematika je podrobně popsána v celé řadě běžně dostupných učebnic fyzikální chemie, kde v případě hlubšího zájmu lze najít příslušné informace. Připomeňme si jen několik těch skutečně nejdůležitějších pojmů a vztahů.

Chemický potenciál je mírou **volné energie jednoho molu chemické látky**

Volná energie = ta část energie určité chemické látky, kterou lze v daném systému nějak využít, přesněji **přeměnit v práci**, tedy způsobit změny spojené se **spotřebou energie** (např. mechanické změny - deformace, přesuny částic a těles, ale i překonávání vlivu gravitačního či elektromagnetického pole. Také zahrnuje procesy spojené s **předáním energie** jinému systému či s **přeměnou do jiné formy energie**.

Gibbsova volná energie, užívaná u chemických soustav je definována pro **izotermické podmínky** (vliv změn teploty tedy není brán v úvahu). Ne vždy však s ní můžeme operovat ve fyziologii rostlin!

Aktuální hodnota chemického potenciálu látky n ($\mu_n, \text{J mol}^{-1}$)

je závislá na působení celé řady okolností, v jakých se látka nachází, a které označujeme jako **složky chemického potenciálu**, např.:

tlak, koncentrace látky, elektrický náboj částic látky, poloha v gravitačním poli, poloha v elektromagnetickém poli, působení přítomných jiných látek ...

Aktuální hodnotu chemického potenciálu je výhodné stanovovat a vyjadřovat jako **odchylku od chemického potenciálu téže látky za standardních podmínek (μ_n^0)**

Tok vody mezi dvěma místy v rostlině může nastat pouze tehdy, jestliže voda na těchto místech má rozdílný chemický potenciál. **Voda vždy proudí z místa na kterém má vyšší chemický potenciál do místa s potenciálem nižším** (pochopitelně za předpokladu, že mezi těmito místy existuje spojení umožňující průtok). Toto základní pravidlo by nám však v praxi příliš nepomohlo, pokud bychom nebyli schopni posoudit, jaké okolnosti mohou měnit hodnotu chemického potenciálu vody v jednotlivých částech rostliny.

Voda v rostlinách se obvykle nevyskytuje v čistém stavu, ale jako součást roztoků. Hodnota chemického potenciálu vody v roztoku závisí především na množství látek v ní rozpuštěných a dále na tlaku, kterému je v buňkách vystavena.

Čím vyšší je vnitrobuněčný, hydrostatický tlak v buňkách (označovaný též jako *turgorový tlak* či *turgor*), tím vyšší hodnotu má i chemický potenciál vnitrobuněčné vody. S koncentrací rozpuštěných látek (*solutu*) naopak chemický potenciál vody klesá, neboť aktivita molekul vody je omezována interakcemi s molekulami solutu.

Snížení chemického potenciálu vody vlivem rozpuštěných látek lze nejjednodušší odvodit ze snížení tlaku vodních par nad roztokem. Pokud se mezi vodou v kapalně a v plynné fázi ustaví rovnováha, pak i chemické potenciály obou fází musí být shodné. Pokles chemického potenciálu je snáze měřitelný u vody v plynné fázi, a sice ze *snížení tlaku vodních par* v nasyceném stavu (či z dalších charakteristik, které jsou na tomto tlaku přímo závislé, jako je např. hustota vodních par nebo relativní vlhkost vzduchu).

Kromě přímého měření můžeme snížení tlaku vodních par také vypočítat z koncentrace roztoku vyjádřené molárním zlomkem vody. Podle *Raoultova zákona* musí být tlak nasycených vodních par nad roztokem (p_v^r) roven součinu tlaku nasycených vodních par nad čistou vodou (p_v^o) a molárního zlomku vody (X_v):

$$p_v^r = p_v^o \cdot X_v$$

Hodnotu chemického potenciálu vody v roztoku (μ_v^r , za všech ostatních podmínek ve standardním stavu) pak můžeme vypočítat ze vztahu:

$$\mu_v^r = \mu_v^o + RT \ln X_v$$

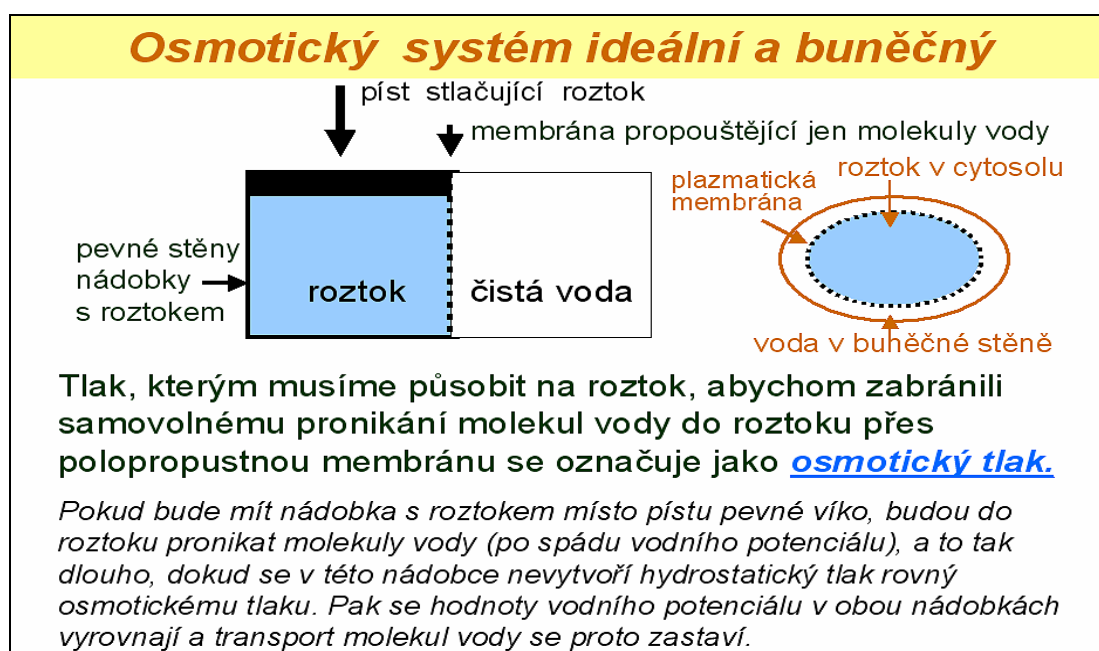
μ_v^o = chemický potenciál čisté vody ($J \text{ mol}^{-1}$),

R = plynová konstanta ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$),

T = absolutní teplota (K).

Chemický potenciál vody je hodnotou relativní (což ostatně platí o potenciálech obecně), udává tedy vždy jen rozdíl mezi energetickým stavem vody za aktuálních podmínek a za podmínek standardních. Hodnota μ_v^o a příslušné standardní podmínky za kterých platí jsou věcí dohody.

Snížení chemického potenciálu vody vlivem rozpuštěných látek lze odvodit také jiným způsobem, a sice z měření (či výpočtu) *osmotického tlaku*.



Osmotický tlak je definován jako *tlak, kterým musíme působit na roztok, abychom zabránili samovolnému pronikání molekul rozpouštědla, které je v čistém stavu odděleno od roztoku polopropustnou membránou*. U roztoků, které nemáme uzavřené v takovéto měrné soustavě, vyjadřují hodnoty osmotického tlaku pouze jejich *potenciální schopnost tento tlak za vhodných podmínek způsobit*. Proto se také někdy používá termín *osmotický potenciál*. Závislost osmotického tlaku (či osmotického potenciálu) na koncentraci roztoku, který je v kontaktu s čistou vodou, popsal na základě přímých měření *van't Hoff*:

$$\pi = RT C i$$

π = osmotický tlak (Pa)

C = koncentrace vyjádřená molalitou roztoku (počet molů rozpuštěné látky na 1 kg vody),

i = parametr zohledňující disociaci (ionizaci) molekul rozpuštěné látky a jiné odchylky od ideálního roztoku.

Vodní potenciál a jeho dvě hlavní složky

Chemický potenciál vyjadřujeme obvykle v jednotkách *energie* na jednotku množství látky, zatímco v biologických systémech jsou z řady důvodů praktičtější jednotky *tlaku*. Nejde jen o zmíněný a snadno měřitelný osmotický tlak. Aktivitu vody v rostlinách velice ovlivňuje i hydrostatický tlak a adhezivní síly, také lépe měřitelné v tlakových jednotkách.

Proto se v biologii častěji používají jako měřítko volné energie vody transformované hodnoty chemického potenciálu, označované jako ***vodní potenciál*** (Ψ): *Vodní potenciál je chemický potenciál vody v systému vyjádřený v jednotkách tlaku a srovnávaný s chemickým potenciálem čisté vody za atmosférického tlaku a téže teploty*.

$$\Psi = \frac{\mu_v^r - \mu_v^0}{V_v}$$

Ψ = vodní potenciál (Pa)

μ_v^r = chemický potenciál vody v roztoku (obecně v systému),

μ_v^0 = chemický potenciál čisté vody,

V_v = molární objem vody (18.016 cm³ mol⁻¹).

Převedení na jednotky tlaku je umožněno vztažením rozdílu chemických potenciálů na objemovou jednotku (V_v). Mezi vodním potenciálem a chemickým potenciálem vody existuje prakticky lineární závislost, neboť molární objem vody je veličinou téměř konstantní. Je proto samozřejmě možné popisovat stejné děje v rostlinách jak hodnotami vodního potenciálu, tak i původního chemického potenciálu.

Referenční *hodnota chemického potenciálu čisté vody* (μ_v^0), je pro výpočet vodního potenciálu konvenčně brána jako *nulová za atmosférického tlaku a téže teploty, jako má voda v systému*, což zjednodušuje výpočty. Současně to znamená, že hodnoty vodního potenciálu roztoků v rostlinách jsou téměř vždy záporné (= nižší než chemický potenciál čisté vody).

Pro vodní potenciál v rostlinách platí totéž, co již bylo řečeno na začátku této kapitoly ve spojitosti s chemickým potenciálem vody: je zvyšován působením hydrostatického tlaku (obvykle jde o turgorový tlak v buňkách), a naopak snižován vzrůstající koncentrací rozpuštěných látek. Vliv koncentrace lze na společné tlakové jednotky převést nejsnadněji pomocí osmotického tlaku (π), jak již bylo vysvětleno. Potom platí (zjednodušeně):

$$\Psi = p - \pi$$

Je důležité si uvědomit, že *hydrostatický tlak* (p) v tomto vztahu považujeme za *nulový, pokud má stejnou hodnotu jako tlak vzduchu v okolní atmosféře* (i když v absolutním měřítku nemá tlak vzduchu v atmosféře nulovou hodnotu, ale přibližně +0,1 MPa!). Pokud tedy tlak v buňkách poklesne na hodnotu tlaku vzduchu v okolí rostliny (např. při ztrátě turgoru za nedostatku vody, který se projeví vadnutím rostliny), pak vodní potenciál buněk bude číselně roven osmotickému tlaku jejich vnitřních roztoků (ovšem se záporným znaménkem).

Pokud by však došlo v buněčných strukturách k poklesu tlaku pod hodnotu tlaku vzduchu v okolní atmosféře (což označujeme jako podtlak nebo též napětí), hodnota p pak bude záporná a to způsobí pokles vodního potenciálu pod hodnotu danou osmotickým tlakem. K tomu běžně dochází při transportu vody ve vodivých elementech xylému, kde se výparem z listů vytváří podtlak snižující vodní potenciál transportovaných roztoků.

Hodnoty koncentrační (osmotické) i tlakové složky vodního potenciálu se mohou v různých částech rostliny poměrně rychle měnit, a tudíž i jejich *relativní významnost* pro výsledný vodní potenciál může být různá. Dost užitečné je vycházet ze zjednodušené představy *buňky jako osmotického systému*, odděleného od apoplastového okolí polopropustnou plazmatickou membránou (viz obrázek na předcházející straně). V takovém případě musí dojít v ustáleném stavu k vyrovnání chemického potenciálu vody (vodního potenciálu) uvnitř buňky s chemickým potenciálem vody ve vnějším prostředí. Pokud tedy mají buňky ve svém okolí dostatek „čisté“ vody (mám teď na mysli vodu s minimálním obsahem solí, jaká obvykle bývá v apoplastu), pak i při velkém obsahu osmoticky aktivních látek ve vakuole či v cytosolu může vodní potenciál těchto buněk dosáhnout téměř maximální (nulové) hodnoty.

Osmotickým příjmem vody se může uvnitř buněk zvýšit hydrostatický tlak natolik, že zcela kompenzuje negativní působení rozpuštěných látek (= osmotické složky) na snížení vodního potenciálu ($p - \pi = 0$). Při dostatečně pevných, téměř neroztažných buněčných stěnách (které jsou charakteristické právě jen pro rostlinné buňky), stačí k tomuto zvýšení hydrostatického tlaku příjem velmi malého množství vody. Současně však platí, že při velmi malé ztrátě vody rychle poklesá vodní potenciál.

Vliv okolního prostředí na vodní potenciál a turgor v buňce – základní pravidla

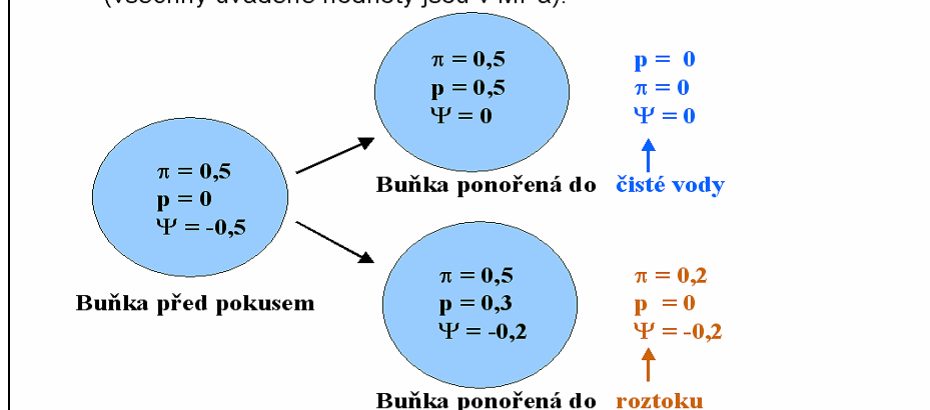
- po jisté době se hodnoty vodního potenciálu buňky **vyrovnají** s hodnotami vodního potenciálu okolního prostředí,
- maximální turgorový tlak v buňce **obklopené čistou vodou** je roven osmotickému tlaku buňky,
- maximální turgorový tlak v buňce **obklopené roztokem** odpovídá rozdílu osmotických tlaků buňky a roztoku v okolí.

Vnitřní řízení osmotických dějů v rostlinných buňkách a jeho význam

- Rostlinné buňky mohou **rychle měnit svůj osmotický tlak**, a to především transportem iontů draslíku přes plasmatickou membránu v obou směrech,
- Díky pevné buněčné stěně mohou rostlinné buňky zvýšit turgorový tlak (a tím i vodní potenciál) již při osmotickém příjmu velmi malého množství vody,
- Osmoticky dosažené zvýšení hodnot vodního potenciálu zvyšuje rychlost biochemických procesů,
- Osmoticky dosažené zvýšení turgoru je nutné pro zajištění **mechanické pevnosti** orgánů rostliny a je také nutnou podmínkou pro **prodlužovací růst** buněk.

Příklad výpočtu změn tlaku v buňkách v závislosti na změnách vnějšího prostředí

Vycházíme ze základního vztahu: $\Psi = p - \pi$ ($\Rightarrow p = \Psi + \pi$)
(všechny uváděné hodnoty jsou v MPa).



Další, méně významné složky vodního potenciálu

Na rozdíl od běžného stanovování chemického potenciálu látek v chemickém výzkumu, při práci s rostlinami se jedná o systémy komplexnější a rozměrnější. Při transportu vody do větších výšek (tedy především u stromů), je potřeba dodat jisté množství energie na překonání **gravitace**. Potom tedy platí, že *voda (čistá či v roztoku) ve větší výšce než je referenční vzorek (téhož složení a za téhož tlaku) má vodní potenciál zvýšený o gravitační složku*. Při transportu vody do výšky 10 metrů nad místem jejího příjmu je hodnota vodního potenciálu této vody zvýšena přibližně o 0,1 MPa, při transportu do 100 m pak o 1 MPa..

Kromě tlakové, osmotické a gravitační složky vodního potenciálu se někdy uvádí ještě další, označovaná jako **složka matriční**, která způsobuje snížení vodního potenciálu při interakci molekul vody s povrchy pevných látek. V běžném vodním režimu rostliny má vcelku zanedbatelný význam. K matriční složce vodního potenciálu se například počítá snížení vodního potenciálu vazbou molekul vody na koloidní částice v půdě, na struktury uvnitř buňky (např. proteiny, membrány), a v buněčných stěnách (fibrily celulozy). Molekuly vody mohou vytvářet velmi tenké hydratační obaly kolem pevných částic, ve kterých jsou poutány silami o velikosti i několika desítek MPa. Pokud je ovšem přítomna také voda hydratačně nevázaná (což je vždy kromě případů extrémního vyschnutí), pak její vodní potenciál určuje celkový vodní potenciál v příslušné struktuře.

Vazba vody v buněčných stěnách, zahrnovaná též někdy do matričního potenciálu, může být i poněkud jiného charakteru. Jde o vodu poutanou *kapilárními silami* (o kterých se ještě zmíním později) v jemných pórech těchto stěn. Vlivem adheze molekul vody k pevným stěnám pórů (tedy v podstatě kapilár), dochází ke snížení hydrostatického tlaku ve vodním sloupečku pod úrovní menisku. Proto lze její vliv na snížení vodního potenciálu v buněčné stěně zahrnout spíše do tlakové složky (**p**). *Tlakový rozdíl* způsobený kapilárními silami ve vysychajících buněčných stěnách (i u mrtvých buněk, např. dřeva) může dosáhnout opět řádově desítky MPa. Prakticky se projevuje např. při botnání dřeva a suchých semen (*imbiční síly*). Jak uvidíme později, kapilární síly mají zásadní význam i pro transport vody ve xylému.

Pomocí hodnot vodního potenciálu (Ψ) můžeme poměrně jednoduchým způsobem kvantifikovat termodynamický stav vody nejen v rostlině, ale i v jejím okolí. To má zvlášť velký význam pro ekologickou fyziologii, která studuje interakce rostlin s prostředím. Při studiu vodního režimu rostlin se obvykle snažíme o *kvantifikaci celého toku vody z půdy přes rostlinu do atmosféry*. Voda protéká tímto směrem jen v tom případě, pokud existuje stálý rozdíl mezi hodnotami Ψ půdní vody v okolí kořenů (kde musí být nejvyšší) a hodnotami Ψ

vody v orgánech rostliny (postupně klesající od kořenů k listům). Nejnižší hodnotu Ψ pak musí mít voda (ve formě vodní páry) ve vzduchu v okolí listů (viz obrázek na str. 12). Hodnoty Ψ půdy jsou za příznivých vlhkostních podmínek velmi vysoké (blízké nule), neboť koncentrace solí v půdním roztoku bývá obvykle velmi malá a tlaková složka se zde prakticky neuplatňuje - vzduch v půdních pórech má stejný tlak, jaký je v okolní atmosféře. Naopak vodní potenciál vzduchu v okolí nadzemních částí rostlin bývá v denních hodinách velice nízký. Jeho hodnotu lze vypočítat z naměřené relativní vlhkosti vzduchu (w , vyjádřené desetinným zlomkem v logaritmickém tvaru) a teploty (T , v Kelvinech), protože poměr mezi plynovou konstantou (R) a molárním objemem vody (V_v) je téměř stálý:

$$\Psi \text{ (MPa)} = \frac{RT}{V_v} \ln w = 0,4618 \cdot T \cdot \ln w$$

Je-li tedy např. relativní vlhkost vzduchu 0,5 (tedy 50%, což je běžné) a teplota vzduchu 20 °C (= 293,15 K), pak $\Psi = -93,8$ MPa. V nočních hodinách však často bývá vzduch nasycen vodní parou (100% relativní vlhkost) - v tom případě Ψ vzduchu se radikálně zvýší na hodnotu blízkou nule a tok vody celým systémem se zastaví.

Příklady hodnot vodního potenciálu (vše v MPa).

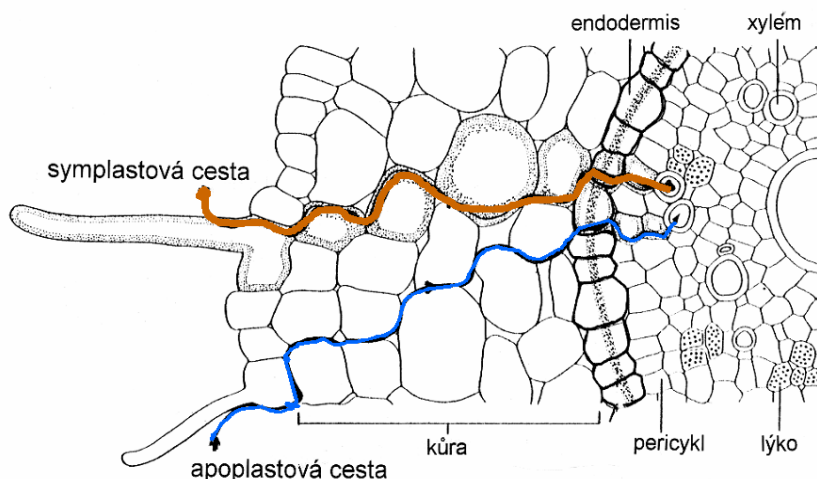
1 M roztok glukózy (nedisociující látka)	-2,5
1 M roztok NaCl (v roztoku disociuje)	-4,4
vlhká půda	-0,01 až -0,05
půda vyschlá k bodu trvalého vadnutí	-1,5
kořeny	-0,1 až -1,5
listy (v průběhu dne, bez plné turgescence)	-0,2 až -2,0
vzduch při relativní vlhkosti 100 %	-0,0
vzduch při relativní vlhkosti 98 %	-2,7
vzduch při relativní vlhkosti 70%	-48,3

Příjem vody kořeny a radiální transport

Kořeny jsou hlavním místem vstupu vody z vnějšího prostředí do rostliny. Neaktivnější zóna příjmu vody u mladých kořenů leží asi 10 až 50 mm od kořenové špičky, tedy tam, kde obvykle dochází k největší tvorbě kořenových vlásků. V této části kořene bývají již dokonale vyvinuty vodivé elementy xylému. U starších částí kořene sorpční aktivita klesá, hlavně v důsledku suberinizace (zkorkovatění) jejich povrchových pletiv. Avšak i u těchto kořenů je obvykle příjem vody měřitelný a vzhledem k jejich ploše i dosti významný.

Kořenové vlásky jsou modifikované epidermální buňky, ale jejich schopnost přijímat vodu pro vodu (vztaženo na jednotku povrchu) není o nic větší než u ostatních epidermálních buněk. Výrazně se však podílejí na zvětšení *celkového* sorpčního povrchu kořenů i na zvětšení objemu půdy, který může celá kořenová soustava využívat. Vzhledem ke svým rozměrům pronikají i do velmi malých pórů v půdních strukturách, ve kterých se v suché půdě nejdéle udržují zbytky vody.

Příjem vody z půdy do kořenů je možný pouze tehdy, je-li vodní potenciál půdního roztoku vyšší než vodní potenciál vody v kořenech (v opačném případě by mohlo docházet i k toku vody z rostliny do suché půdy!). Rychlost příjmu vody závisí jednak na velikosti rozdílů (gradientu, spádu) vodních potenciálů, jednak na hydraulické vodivosti kořenových pletiv v příčném (radiálním) směru, tedy od epidermis ke xylému. Obvykle se rozlišují dvě hlavní možnosti pohybu vody v radiálním směru: *apoplastová cesta*, při které voda do cytoplazmy nevstupuje, ale pohybuje se pouze buněčnými stěnami a volnými mezibuněčnými prostory, a *symplastová cesta*, kdy voda vstupuje do cytoplazmy a pokračuje v dalším pohybu pouze v symplastu:



Schema symplastové a apoplastové cesty transportu vody a rozpuštěných látek v kořenových pletivech.

Obvykle se současně využívají obě cesty. Vstup vody do symplastu (tedy z buněčných stěn do protoplastů kořenových buněk přes jejich plasmatické membrány) je možný podél celého apoplastového toku. Přesto odpor, který musí voda překonávat při poměrně krátkém radiálním transportu, může být někdy vyšší než při toku vodivými elementy xylému.

Souvislý tok vody apoplastovou cestou buněčnými stěnami z epidermis až do xylému (který je také apoplastovou strukturou), tedy bez jediného přestupu přes cytoplazmatickou membránu, není možný. V cestě tomuto toku stojí totiž suberinem impregnované (a tudíž pro vodu nepropustné) radiální části buněčných stěn v *endodermis* (*Caspariho proužky*). Navíc, jak bylo nyní dokázáno, u kořenů většiny rostlin (88% druhů z dosud zkoumaných 52 čeledí) je vyvinuta kromě *endodermis* ještě *exodermis*, což je podpokožková vrstva buněk s obdobnou stavbou jakou má *endodermis*. buňky těchto vrstev nejsou samozřejmě zcela nepropustné pro vodu - ta ovšem musí nejprve vstoupit přes plasmatickou membránu do jejich vnitřního roztoku (cytosolu), tedy do symplastu. Další mezibuněčný transport vody a rozpuštěných látek velmi usnadňují hojná *plazmodezmata*, což jsou volně propustné kanálky v buněčné stěně nepokryté plasmatickou membránou. Vstup vody do vodivých elementů xylému je ale opět spojen s přestupem přes plasmatickou membránu přiléhajících buněk. Na vytvoření nezbytného gradientu (snížením vodního potenciálu v blízkosti xylému) má hlavní podíl podtlak v xylému (zejména v denních hodinách při výparu vody z listů).

Transmembránový transport vody

Příjem vody do rostliny i vnitrobuněčné přesuny vody mezi cytosolem a organelami jsou neodmyslitelně spojeny s transportem přes biologické *membrány*. Jedině díky membránám mohou rostlinné buňky (ale i jejich součásti, zejména vakuoly) fungovat jako osmoticky aktivní systémy. Biologické membrány ovšem nejsou propustné pouze pro vodu, ale též, i když mnohem méně, pro rozpuštěné látky. Nemohou být propustné jen pro vodu už z toho důvodu, že rostlina musí přijímat a transportovat ionty solí i menší organické molekuly. Odchytky od vlastností ideálně polopropustné membrány způsobují, že buňky nemohou nikdy dosáhnout takového turgorového (hydrostatického) tlaku, který by odpovídal teoretické hodnotě osmotického tlaku, i kdyby byla v jejich okolí čistá voda.

Většina molekul vody proniká přes biologické membrány přes póry vytvářené speciálními *transmembránovými proteiny (akvaporíny)*, s vysokou transportní kapacitou a specifitou právě jen pro molekuly vody. Jejich struktura a funkce je blíže popsána na str. 25 a 26. Rostliny mohou jejich počet (plošnou hustotu) v membránách poměrně rychle měnit (syntézou či rozkladem) podle aktuální potřeby, tedy zda je za daných okolností žádoucí zrychlit či zpomalit transport. Akvaporínů je celá řada typů (= proteinů kódovaných

odlišnými geny) i u téže buňky. Akvaporíny v rostlinných buňkách (na rozdíl od živočišných) nejsou pouhé trvale otevřené kanálky (tedy pravé poríny), jak se dříve soudilo, ale mají schopnost se v případě potřeby zavírat (např. za nedostatku vody v půdě či při zaplavení půdy). V otevřeném stavu je však jejich transportní kapacita neobyčejně vysoká, řádově asi jedna miliarda (10^9) molekul vody za sekundu. V každém případě se jedná o transport pasivní, který není spojen se spotřebou metabolické energie.

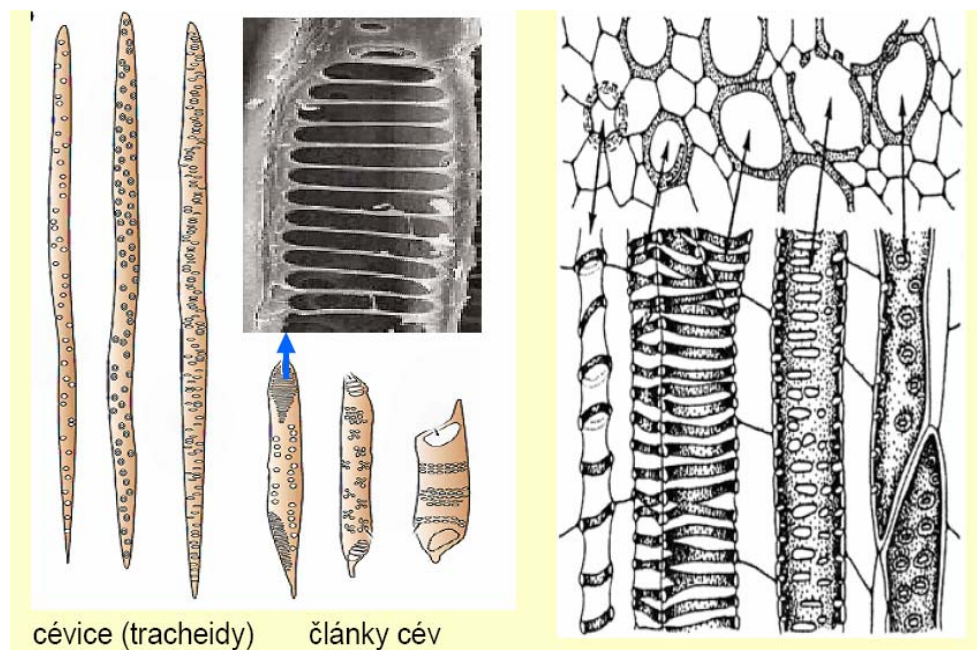
Hybnou silou transportu vody přes membrány je *rozdíl vodních potenciálů* roztoků na obou stranách membrány ($\Delta\Psi$), který je ovšem daný rozdílem tlaků (Δp) a koncentrací roztoků (vyjádřené rozdílem jejich osmotických tlaků, $\Delta\pi$). K tomu ještě přistupují specifické vlastnosti membrány (např. plošná hustota a stupeň otevřenosti akvaporinů) vyjádřené v hodnotách její *hydraulické vodivosti*, L_p)

Rychlost toku vody přes membránu (J , $m \cdot s^{-1}$) je pak:

$$J = L_p \cdot \Delta\Psi = L_p \cdot (\Delta p - \Delta\pi)$$

Transport vody v xylému

Dálkový (meziorganový) transport vody v rostlinách probíhá v daleko největší míře ve specializovaných transportních pletivech. Vodivé elementy dřeva (xylému) bývají tvořeny *cévami* (*tracheje*) a *cévicemi* (*tracheidy*). U evolučně starších rostlin (především nahosemenných) nalézáme jen tracheidy.



Tok vody xylémem je v podstatě fyzikální proces, a proto jeho mechanismus je dnes již docela dobře znám. Podle všeobecně uznávané *kohezní teorie* je hybnou silou transportu vody podtlak (tlak menší než atmosférický) ve vodivých elementech xylému, způsobený vypařováním vody v nadzemních částech, tedy na samém konci vodivých drah. Tato teorie byla navržena již na počátku minulého století (Münch 1930), avšak bylo nutné postupně ověřovat základní předpoklady pro fungování celého mechanismu, jako například:

- může vůbec vzniknout v zakončení xylému dostatečně velký podtlak a jakým způsobem?
- má vodní sloupec v cévách natolik velkou soudržnost, aby při velkém snížení tlaku nedošlo k jeho přetržení?
- jakým mechanismem je zabezpečen celý systém proti náhodným poruchám (zejména proti ucpání cév a cévic bublinkami plynů)?

Hlavní síly, které táhnou dlouhé sloupce vody v cévách směrem vzhůru, je tedy nutno

hledat v buněčných stěnách listového mezofylu. Voda v úzkých pórech mezi mikrofibrilami celulózy má velmi ostrý úhel smáčení, daný vysokou přilnavostí (adhezí) molekul vody k celulózovým povrchům. Vezmeme-li ještě v úvahu vysoké povrchové napětí vody, pak negativní tlak, který se v těchto pórech (mikrokapilárách) může pod sloupečky vody vytvořit, je značný (viz rámeček níže).

Zvláštní význam má malý průměr kapilárních pórů, neboť velikost negativního tlaku je na něm úzce závislá. Voda může v kapilárních trubcích xylému zajisté také vzlínat do jisté výšky, a to i bez napojení na listová pletiva. V cévách o průměru např. 100 μm se kapilaritou sníží tlak asi o 0,003 MPa pod hodnotu tlaku atmosférického, což postačuje k vyzdvižení sloupečku vody do výšky pouze 0,3 m. To by ovšem bylo pro transport vody u většiny vyšších rostlin nedostatečné. Kapilární póry v buněčných stěnách jsou však mnohem tenčí - mají průměr jen asi 10 nm. V tom případě lze dosáhnout snížení tlaku až o 30 MPa, což by čistě teoreticky mělo postačovat na transport vody až do výšky 3000 m. V dynamickém systému se stálým tokem (při výparu z listů) však takovýchto hodnot nelze dosáhnout, neboť je potřeba vynaložit jistou sílu i na překonání tření transportované vody o stěny vodivých elementů. Nicméně pro transport i do korun těch nejvyšších stromů (což je asi 100 metrů) by měl být vytvořený podtlak naprosto dostatečný.

SÍLY PŮSOBÍCÍ V KAPILÁŘE :

σ - povrchové napětí vody
 α - kontaktní úhel adheze
 r - poloměr kapiláry
 h - výška sloupečku
 ρ - hustota vody
 g - gravitační zrychlení

$\sigma \cdot \cos \alpha \cdot 2\pi \cdot r$

$\pi \cdot r^2 \cdot h \cdot \rho \cdot g$

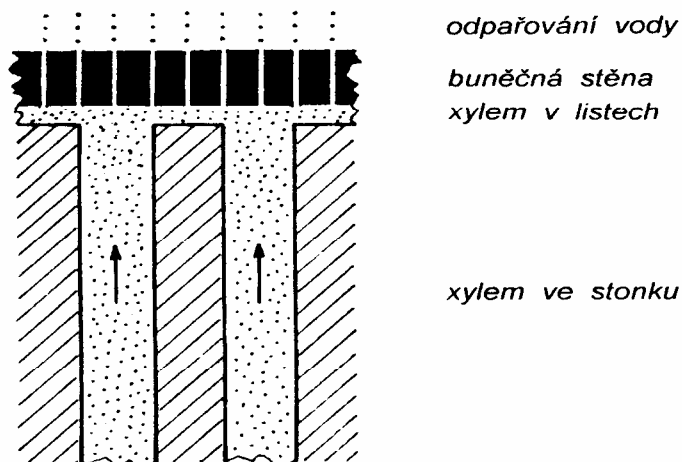
Přibližný výpočet tlaku (p) pod meniskem vody v kapiláře s velkou smáčivostí stěn (cévy, póry v buněčné stěně):

$$p \text{ (MPa)} = -0,3 / 2r$$

Příklady :

Pro cévu v xylému ($r = 25 \mu\text{m}$): $p = -0,006 \text{ MPa}$ ($\approx h = 0,6 \text{ m}$)
 Pro póry v buněčné stěně ($r = 0,005 \mu\text{m}$): $p = -30 \text{ MPa}$ ($\approx h = 3000 \text{ m}$)

Obecné schéma rozložení sil určujících velikost "samovolného" vzestupu sloupečku vody v kapilárách.



Velmi zjednodušené znázornění principu funkce xylémové soustavy v rostlinách, složené ze dvou typů kapilár. Na velmi úzké a krátké kapiláry (tvořené póry v buněčných stěnách listového parenchymu) jsou napojeny široké a dlouhé kapiláry xylému.

System tenkých kapilár v buněčných stěnách, ve kterém lze dosáhnout velkého snížení tlaku, je ale samostatně (bez napojení na širší kapiláry v xylému) nepoužitelný pro transport vody na delší vzdálenosti, neboť *klade toku vody velký odpor* (třením molekul vody o stěny). Ten totiž vzrůstá nejen se zmenšováním průměru kapiláry, ale i s délkou transportní dráhy.

A nyní se podívejme, jaká je *soudržnost vodního sloupce* v cévách. Molekuly vody jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky. K jejich narušení by mělo teoreticky dojít až při hodnotách podtlaku přibližně 30 MPa. V praxi ale takové hodnoty soudržnosti nelze dosáhnout z řady důvodů. Jedním z nich je vliv rozpuštěných látek (včetně plynů), které mohou soudržné síly molekul vody značně snižovat. Z výsledků mnoha pokusů a pozorování vyplývá, že soudržnost vodních sloupečků v cévách je také značně závislá na jejich šířce (průměru). V cévách velmi širokých (400 až 500 μm) může dojít k přetržení sloupce již při podtlaku asi 2 MPa, ve velmi úzkých cévách a cévicích (o průměru 10 až 50 μm) pak při hodnotách mnohem nižších (10 až 20 MPa). Vidíme tedy, že ***úzké vodivé elementy jsou provozně bezpečnější, ovšem na druhé straně kladou toku vody velký odpor (= mají malou hydraulickou vodivost)***. Vodivost totiž vzrůstá se čtvrtou mocninou poloměru kapiláry.

Je proto zřejmé, že nejčastější vnitřní šířka vodivých elementů u rostlin (50-100 μm) je výsledkem kompromisního "řešení" dvou protichůdných požadavků (či lépe řečeno optimalizačního procesu v průběhu evoluce), kdy je zaručena jednak dostatečná vodivost, ale současně i dostatečná bezpečnost provozu. Často je kompromisu dosaženo také zastoupením cév či cévic různé šířky v tomtéž cévním svazku.

Přesto se však může stát (a je to dosti častý případ), že ve vodivých elementech xylému dojde k přetržení některých sloupečků vody a vytvoří se v nich dutiny vyplněné plyny (*kavitace, plynová embolie*). K tomu může dojít jednak při extrémním suchu, kdy hodnoty podtlaku v xylému vzrostou až za kritickou mez soudržnosti molekul vody. Častěji však způsobují kavitaci bublinky plynů, které byly rozpuštěny ve vodě přijímané kořeny a v xylému za velmi sníženého tlaku se z ní uvolňují. K vyloučení plynů může dojít i při zvýšení teploty nadzemních částí (ve srovnání s kořeny), neboť rozpustnost plynů s teplotou klesá. Další velmi častou příčinou kavitace je zamrznutí vody v xylému (spojené se zmenšením jejího objemu) u vytrvalých rostlin v průběhu zimního období. Samozřejmě jakékoli poranění vodivých pletiv (v extrémním případě úplné přerušení, např. u řezaných květin) vede okamžitě ke kavitačnímu ucpání cév a cévic.

Nápravné mechanismy, které umožňují zajistit transport vody i v případě vzniklé kavitace, jsou několikeroého druhu. Většina je ale založena na strukturních adaptacích (zvláštnostech stavby) *xylému*. Perforované *přepážky* na koncích jednotlivých článků cév či cévic jsou účinnou ochranou proti šíření bublinek na větší vzdálenosti (při velkém podtlaku mají původně malé bublinky tendenci rychle expandovat). Jednotlivé cévy či cévice jsou zřídka uloženy paralelně vedle sebe na delším úseku kmene, spíše se složitě proplétají. Proto voda, která vchází do kmene z jedné části kořene, může být současně rozváděna do mnoha větví koruny. Také *kapacita vodivých cest* je obvykle natolik velká, že vyřazení i značného procenta cév z provozu ještě neohroží život rostliny. Některé druhy řeší poškození velkého množství cév v důsledku mrazové kavitace rychlou *tvorbou nových vodivých pletiv* na jaře (jarní přírůstek dřeva).

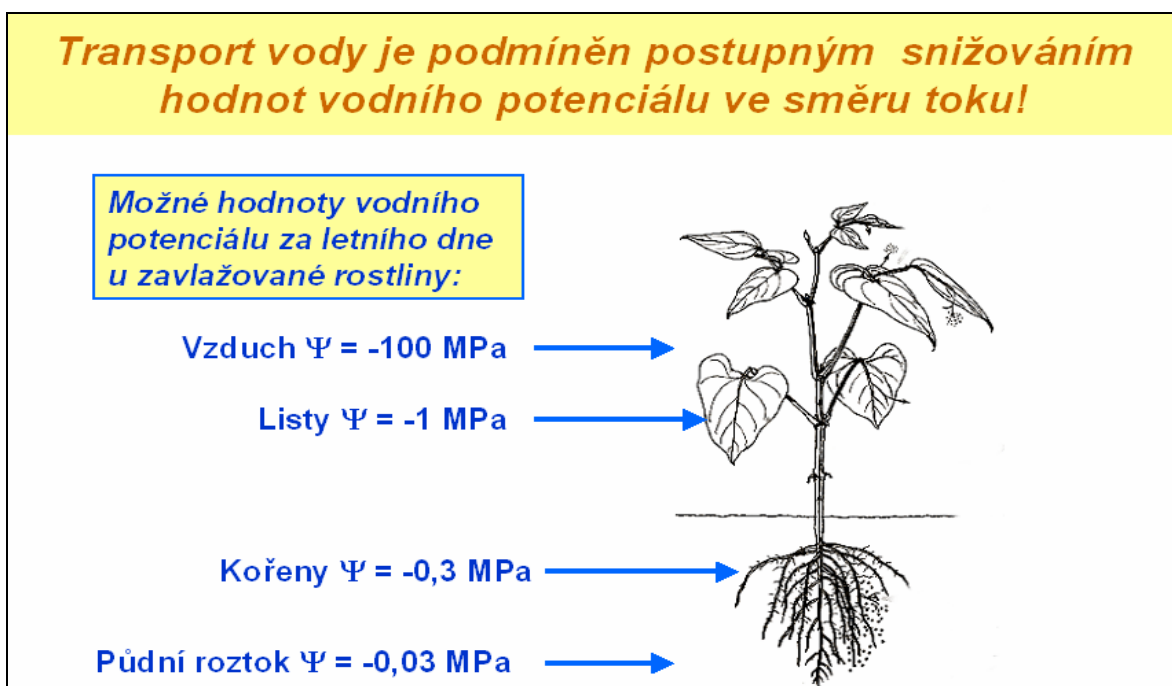
Kromě strukturních předpokladů ještě existují i *funkční mechanismy* nápravy kavitačního poškození cest pro vedení vody. Jsou založeny v první řadě na vytvoření pozitivního tlaku (*přetlaku* ve srovnání s okolní atmosférou). K tomu může dojít několika způsoby. Především v nočních hodinách, kdy vzhledem k vysoké vzdušné vlhkosti je zastaven výpar z rostlin (transpirace), je zastaven i xylémový tok. Přesto však dochází k membránovému transportu iontů (hlavně minerálních živin) do zakončení xylému v kořenech, neboť jejich transport je řízen zcela jinými mechanismy než transport vody, jak bude ještě blíže popsáno v další části tohoto textu. Osmoticky aktivní látky se v xylému hromadí neboť jejich pohyb pouze difusí

(bez toku celého roztoku) je velice pomalý. Následuje osmoticky podmíněný přesun vody z okolního parenchymu do cév a tím i zvyšování tlaku v cévách, někdy až na hodnotu 0,02 MPa. Tento jev je běžný zejména u většiny bylin. Vytvořený přetlak ve vodivých elementech xylému, označovaný také jako **kořenový vztlak** vede k opětovnému spojení většiny přerušovaných sloupečků.

U některých druhů rostlin, zejména u většiny dřevin, nebývá kořenový vztlak v nočních hodinách měřitelný. Přesto i u nich existuje možnost dočasněho vytvoření přetlaku v xylému. Principem je opět aktivní (metabolickou energií podmíněný) transport osmoticky aktivních látek do poškozených cév a cévic ze sousedících parenchymových buněk spojený s pasivním (osmotickým, tedy difusním) příjmem vody. K tomuto přestupu nedochází v kořenech, ale přímo v nadzemních částech v blízkosti poškozeného místa. Na rozdíl od kořenového vztlaku, ke kterému za příznivých podmínek (dostatek vody a živin v půdě) dochází bez ohledu na potřebu odstranění kavitace, osmotické zvyšování tlaku přímo ve stoncích bývá kavitačním poškozením části xylému vyvoláno. Celý mechanismus této indukce není dosud dostatečně znám.

Zdaleka ne všechny mechanismy nápravy poškozených cév a cévic (včetně regulace tlakových změn) jsou v současné době uspokojivě prozkoumány a výzkum této problematiky je proto velmi živý. Je také potřeba upozornit, že odstraňování kavitace nemusí být ve všech případech úspěšné. U většiny stromů bývá pozorován v průběhu vegetační sezóny postupný úbytek plně funkčních vodivých elementů xylému, které jsou v následujícím roce nahrazovány novými.

Ještě zbývá uvést několik údajů o *maximální rychlosti transportu tekutin v xylému*. Za předpokladu, že tok vody není omezen na vstupu a výstupu, je jeho rychlost závislá na rozdílu hydrostatického tlaku mezi začátkem a koncem vodivých cest a dále na hydraulické vodivosti cév a cévic, která, jak již víme, je dána především jejich vnitřní šířkou (světlostí). Maximální rychlosti toku vody, naměřené u listnatých stromů se širokými cévami (100 až 500 μm , jaké mají např. dub, jasan, jilm) dosahují až 45 metrů za hodinu. Ještě vyšší rychlost byla naměřena u některých lian. U druhů s úzkými cévami (nejčastěji 40 až 80 μm , např. bříza, ovocné stromy) a u všech jehličnatých stromů (tracheidy jsou zvláště úzké, jen asi 10 až 25 μm) bývají maximální rychlosti toku vody jen 1 až 6 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$.



Metody stanovení hlavních charakteristik stavu vody v rostlinách

Vodní potenciál je velmi obtížné stanovit nedestruktivně, tedy u neporušených rostlin či jejich částí. Obvykle proto pracujeme s odříznutými vzorky různé velikosti. K vlastnímu stanovení se nejčastěji používají dva principiálně odlišné přístupy.

Metoda hygrometrická vychází ze vztahu mezi relativní vlhkostí vzduchu a jeho vodním potenciálem, který byl již uveden. Uzavřeme-li vzorek rostliny (nebo půdy, roztoku či jiného materiálu) do vhodné nádoby, pak se v ní po jisté době ustaví relativní vlhkost odpovídající vodnímu potenciálu ve vzorku. K přesnému měření vlhkosti vzduchu v nádobce (nejméně na 0,1%, a to ještě v oblasti blízké úplnému nasycení) se používají různé speciální postupy. K nejčastějším patří komůrky vybavené miniaturními teplotními čidly (termočláanky), jimiž se nejprve změří *psychrometrický rozdíl* (= rozdíl mezi teplotou suchého a ovlhčeného čidla) a z tohoto rozdílu se pak vypočítá či odečte v psychrometrických tabulkách hodnota relativní vlhkosti.

Jiné (modernější) typy aparatur jsou vybaveny miniaturními čidly pro *měření teploty rosného bodu*, ze které lze snadno vypočítat relativní vlhkost vzduchu. V tom případě je čidlo (obvykle miniaturní kovové zrcátko, umístěné v komůrce nad měřeným vzorkem) elektricky zchlazováno a při počátku orosení se odečte jeho teplota (= teplota rosného bodu vzduchu nad vzorkem).

Při praktickém použití uvedených přístrojů se hodnoty vodního potenciálu měřených vzorků obvykle nezjišťují výpočtem z naměřených hodnot vlhkosti vzduchu, ale odečítají se z kalibrační křivky daného měřicího zařízení, získané měřením série vzorků o známém vodním potenciálu (obvykle roztoků solí o různé koncentraci). Podmínkou přesného měření jsou přísně izotermické podmínky (čidlo, vzorek a vzduch v nádobce).

Metoda tlaková je založena na měření tlaku který je nutno vynaložit, aby se kompenzovalo snížení vodního potenciálu v pletivech rostliny. Část rostliny se uzavře do silnostěnné kovové nádoby, ovšem tak, aby řezná plocha (obvykle řapíku listu či stonku) procházela víkem na vnější stranu. V nádobce pak pomalu zvyšujeme tlak (z připojené nádoby se stlačeným vzduchem) a současně pozorujeme řeznou plochu. Jakmile se na ní objeví první kapičky vytlačené šťávy, odečteme hodnotu tlaku v nádobě se vzorkem. Tato hodnota numericky odpovídá vodnímu potenciálu vzorku. Při přesné práci je nutno ještě od ní odečíst hodnotu osmotického tlaku vytlačené šťávy. Ta ovšem bývá obvykle blízká nule, neboť šťáva je z buněk vytlačována v podstatě procesem *reverzní osmózy*, a mělo by tudíž jít o téměř čistou vodu. Tlaková metoda je v současné době využívána i pro stanovení řady dalších charakteristik stavu vody v rostlině (osmotické a tlakové složky vodního potenciálu, obsahu vody při nulovém tlakovém potenciálu, specifické vodivosti xylému pro transport kapalně vody a k získávání vzorků xylémové tekutiny pro chemické analýzy).

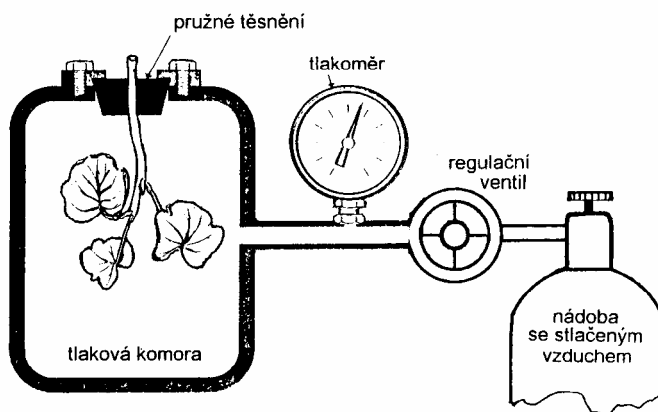


Schéma aparatury pro měření vodního potenciálu tlakovou metodou.

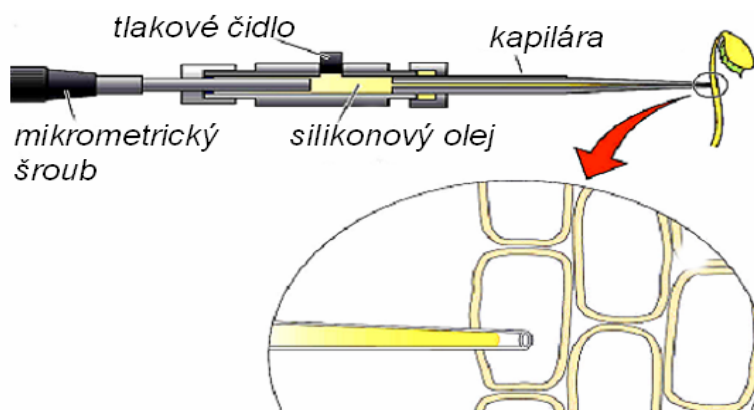
Existuje i řada starších metod, které se dnes používají zřídka. Patří k nim např. testování, jaká koncentrace vhodného osmotika (o známém osmotickém tlaku, a tudíž i známém vodním potenciálu) způsobí počínající plazmolýzu. Při hledání izotonického roztoku můžeme také postupovat tak, že ponecháme série shodných vzorků ponořené ve vhodně odstupňovaných koncentracích osmotika a po jisté době měříme změnu jejich délky či hmotnosti, nebo též změnu koncentrace roztoků pod vlivem expozice vzorků.

Osmotický tlak (π) se dnes už neměří pomocí klasických membránových osmometrů (zejména pro potíže s vhodnou membránou a časovou náročnost). Nejčastěji používáme *metodu kryoskopickou*. Při kryoskopii měříme *snížení bodu tuhnutí roztoku (b , $\Delta^\circ\text{C}$)*, tedy v našem případě buněčných šťáv vylisovaných z rostliny. Bod tuhnutí je koligativní (= na množství částic v roztoku závislá) vlastnost roztoků, stejně tak jako osmotický tlak (π), a vztah mezi nimi je prakticky lineární:

$$\pi \text{ (MPa)} = 1,22 b$$

K měření osmotické složky vodního potenciálu lze využít i *hygrometrickou metodu*, zmíněnou v souvislosti s měřením celkového vodního potenciálu. Vzorek rostliny však nejprve usmrtíme (např. krátkým zmrazením). Poškozením membrán poklesne turgor na nulu a je tudíž vyloučena spoluúčast tlakové složky vodního potenciálu.

Turgorový tlak (= tlakovou složku vodního potenciálu, **p**) můžeme nepřímo stanovit z rozdílu mezi celkovým vodním potenciálem a osmotickým tlakem. V současné době však nabývá na stále větším významu přímé měření hydrostatického tlaku v buňkách (turgoru) pomocí tlakových sond. Při tomto postupu opatrně zavedeme tenkou skleněnou kapiláru naplněnou silikonovým olejem do nitra buňky. Kapilára je napojena na přesný elektrický tlakoměr. Při zavádění kapiláry a v průběhu vlastního měření se nesmí změnit původní objem buňky, neboť by to vážným způsobem ovlivnilo hodnoty měřeného tlaku.



Rychlosti toku vody rostlinou lze principiálně zjišťovat měřením jejího *příjmu* (např. z úbytku objemu živného roztoku, ve kterém pokusnou rostlinu pěstujeme), nebo z *výdeje* vody z rostliny ve formě vodní páry (např. gazometricky ze zvýšení vlhkosti vzduchu v okolí rostliny). To je ovšem vhodné spíše pro laboratorní pokusy s poměrně malými rostlinami

Pro terénní měření jsou metody stanovování rychlosti xylémového toku založené na principu *přenosu tepla*. Jestliže bodově ohřejeme jistou část stonku, šíření tepla ve směru toku vody bude rychlejší než v opačném směru neboť teplo bude částečně přenášeno i konvekčně, proudící vodou). Proto také teplota stonku v jisté vzdálenosti nad místem ohřevu bude vyšší než ve stejné vzdálenosti od místa ohřevu směrem dolů. Známe-li množství dodávaného tepla, pak ze zjištěného teplotního rozdílu můžeme vypočítat množství protékající vody a z rychlosti reakce po tepelném impulzu také rychlost proudění. Stonek musí být v místě měření velmi dobře izolován proti ztrátám tepla do vzduchu.

Příjem a transport iontů solí

Rostliny svými kořeny přijímají nejen vodu, ale i celou řadu jiných chemických látek, ze kterých daleko nejhojnější jsou ionty jednoduchých anorganických solí. Ty nejdůležitější z nich, nezbytné pro metabolismus rostliny, označujeme jako *minerální živiny*. Představa, že rostlina nasává kořeny půdní roztok, tedy že přijímá rozpuštěné látky do svých buněk ve stejné koncentraci, v jaké jsou v půdním roztoku, by byla krajně nesprávná. Není to možné už z toho důvodu, že poměrný podíl jednotlivých látek v půdním roztoku naprosto neodpovídá jejich zastoupení v rostlinné biomase. Neregulovaný příjem by velmi rychle vedl ke vzniku toxicky vysokých koncentrací jedněch prvků a k vážnému nedostatku jiných prvků v těle rostliny.

Mechanismus příjmu a transportu iontů solí se tedy nutně odlišuje od procesů spojených s příjmem a transportem vody. Musí splňovat tyto základní předpoklady:

a) Vzhledem k velmi nízké koncentraci většiny iontů minerálních živin v půdním roztoku (často o několik řádů nižší, než nacházíme v buňkách kořenů), je nutné zajistit transport těchto iontů z nižší koncentrace do vyšší.

b) Vzhledem k velkým rozdílům mezi koncentracemi jednotlivých iontů živin v půdním roztoku a potřebami rostliny, musí mít kořeny schopnost *regulovat příjem každého iontu odděleně od ostatních*.

Podívejme se nyní, jakým způsobem je u rostlin zajištěno, že uvedené požadavky budou skutečně uspokojeny.

Buněčné membrány jako předpoklad řízeného příjmu iontů solí

Příjem iontů solí kořeny začíná jejich vstupem ve vodním roztoku do buněčných stěn epidermis, odkud mohou buď přecházet přes plazmatickou membránu (plazmalemu) do cytoplazmy, nebo pokračovat v putování apoplastem až k endodermis a přitom postupně vstupovat do cytoplazmy korových buněk. Část iontů může být do buněk kůry vnášena i hyfami mykorrhizických hub. Dříve nebo později však musí dojít k přestupu iontů přes plazmalemu a často i přes další vnitrobuněčné membrány.

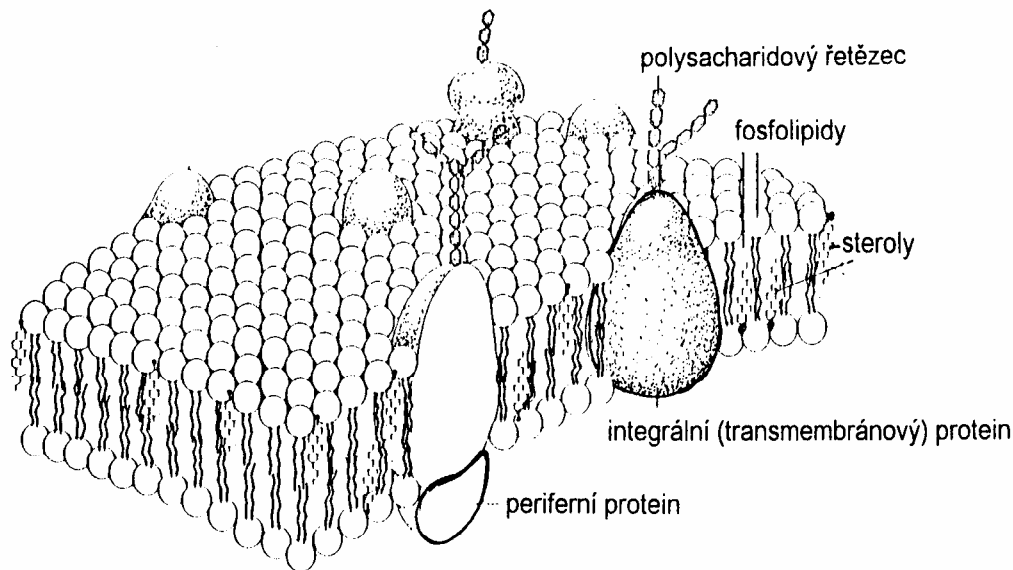
Jsou to právě *membrány buněk*, které mají hlavní podíl na řízení příjmu a transportu iontů solí a na zmíněných odlišnostech od příjmu vody. Poznání stavby a funkce buněčných membrán má proto klíčový význam pro pochopení celého mechanismu. Obecnými vlastnostmi membrán se zabývají detailně jiné vědní obory, zejména buněčná biologie a biofyzika. Připomeňme si alespoň několik nejdůležitějších údajů, které jsou pro náš další výklad skutečně nezbytné.

Základní stavba u všech biologických membrán je podobná, i když v detailech lze nalézt rozdíly, a to jak uvnitř téže buňky, tak i mezi orgány a druhy. Z hlediska hrubého látkového složení jde o směs proteinů a lipidů přibližně ve stejném poměru. Na některé z nich (2 až 10%) bývají navázány sacharidy. Kvalitativně významná je také vazba iontů vápníku (Ca^{2+}), bez kterých je funkce většiny membrám vážně poškozena.

Lipidovou složku membrán rostlinných buněk tvoří zejména:

- *fosfolipidy* (nejčastěji to bývá fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylglycerol),
- *glykolipidy* (monogalaktosyldiglycerid a digalaktosyldiglycerid)
- *steroly* (hlavně sitosterol, stigmasterol, campesterol a jen poměrně vzácně cholesterol, který je naopak velmi hojný v živočišných buňkách).

Základní hmota membrány je tvořena dvěma vrstvami molekul lipidů, které k sobě přisedají hydrofobními řetězci mastných kyselin a zbylá hydrofilní část je orientována k vnějšímu povrchu. Na délce řetězců a počtu dvojných vazeb mastných kyselin jsou značně závislé fyzikální vlastnosti celé membrány. Lipidová dvojvrstva je pro ionty a větší polární molekuly prakticky nepropustná, takže velmi dobře odděluje buňku od vnějšího prostředí (funkce bariéry). Přitom je ale natolik tekutá, aby v ní mohlo docházet ke snadným výměnám, přemísťování a konformačním změnám membránových bílkovin. Strukturní vlastnosti lipidové dvojvrstvy zásadním způsobem ovlivňuje přítomnost sterolů. Udržují uhlíkové řetězce fosfolipidů v uspořádaném stavu a tím snižují tekutost a propustnost membrány. Podíl molekul sterolů velice kolísá jak u membrán různých rostlinných druhů, tak i u různých orgánů téhož druhu. Mění se a také působením rozdílných faktorů vnějšího prostředí.



Klasická představa buněčné membrány jako fluidní mozaiky.

Membránové proteiny můžeme rozdělit z funkčního hlediska do několika skupin:

- *transportní proteiny* umožňují transport iontů i větších molekul organických látek přes membránu. Patří k nim poriny, selektivní kanály a přenašeče (včetně protonových pump),
- *receptory signálů a rozlišovače cizích molekul*. Přenášejí signály z vnějšího prostředí k přenosovému řetězci v buňce. Dále rozlišují, které molekuly proteinů a polysacharidů budou odmítnuty nebo naopak přijaty pro další zpracování (obvykle jde o transport). K této rozlišovací funkci slouží především glykoproteiny.
- *strukturní proteiny*, které zpevňují a stabilizují strukturu membrán,

Z hlediska lokalizace v membráně rozdělujeme proteiny na *transmembránové (integrální)*, prostupující celou lipidovou dvojvrstvou, a *periferní*, které poměrně volně přisedají na povrch jedné strany membrány.

Vnitřní dvojitá vrstva lipidů dává biologickým membránám vlastnost elektricky izolujícího materiálu (dielektrika). Již velmi malá odchylka od elektroneutality v buněčném prostředí vytváří významný rozdíl v elektrickém potenciálu roztoků na obou stranách membrány. Tento rozdíl může dosahovat až několika set milivoltů, přičemž cytosolová strana má negativní hodnoty elektrického potenciálu, zatímco elektrický potenciál vnějšího prostředí bývá považován konvenčně za nulový (standardní).

Význam elektrochemického gradientu pro transport iontů

Obdobně jako u transportu vody, i ionty rozpuštěných látek se mohou pohybovat jak difuzí, tak i hromadným (konvekčním) tokem, v tom druhém případě ovšem jen ve společném proudu s molekulami vody. Hromadný tok je mnohem rychlejší než difuze a tudíž neobyčejně důležitý při dálkovém transportu nejen vody, ale i v ní rozpuštěných látek. Ovšem hromadný tok se v rostlinách uplatňuje převážně jen ve vodivých elementech cévních svazků. Buněčné membrány představují nepřekonatelnou překážku pro hromadný tok, a proto transmembránový transport se děje buď difuzí, nebo zvláštními, energeticky dotovanými mechanismy.

Pro "samovolný" transport iontů solí difuzí přes buněčné membrány je zásadně důležitý rozdíl v chemickém potenciálu těchto iontů mezi místy oddělenými membránou. To ostatně platí obecně, nejen pro ionty, jak již víme z výkladu o transportu vody. **O chemickém potenciálu iontů solí rozhoduje jejich koncentrace, ale navíc má velký význam i složka elektrická.** Chemický potenciál iontu n v roztoku (μ_n) můžeme tedy zjednodušeně vyjádřit:

$$\mu_n = \mu_n^0 + RT \ln C_n + z_n F E$$

μ_n^0 = chemický potenciál iontu n za standardních podmínek,

RT = součin plynové konstanty a absolutní teploty,

C_n = koncentrace iontu n v roztoku (přesněji jeho aktivita),

z_n = valence iontu n ,

F = Faradayova konstanta ($9,65 \cdot 10^4 \text{ J V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

E = celkový elektrický potenciál roztoku (V).

Vliv rozdílné koncentrace na transport iontů

(ale i jiných rozpuštěných látek)

Chemický potenciál (a tím i volná energie) rozpuštěných látek vzrůstá s jejich koncentrací. Změna volné energie (ΔG) spojená s přesunem 1 molu látky z místa a (o koncentraci C^a) do místa b (o koncentraci C^b) je:

$$\Delta G = RT \ln (C^a/C^b)$$

Pokud je C^b vyšší než C^a (když je potřeba transportovat látku z místa kde má nižší koncentraci do místa s vyšší koncentrací), je nutno dodat energii (= vynaložit práci), v opačném případě se energie uvolňuje - systém tedy může konat práci, transport může tudíž probíhat i bez dodatečné energie (obvykle difusí).

(Např. při rozdílu koncentrací 10 : 1 je $\Delta G = 5,7 \text{ kJ}$).

Vliv rozdílného elektrického potenciálu

(jen pro elektrolyty!)

Změna volné energie (ΔG) spojená s přesunem 1 molu iontů o valenci z z místa a (o elektrickém potenciálu E^a) do místa b (o el. potenciálu E^b):

$$\Delta G = z F (E^b - E^a) \quad [F = \text{Faradayova konstanta}]$$

$$\Delta G = z F \Delta E$$

Při přesunu kationtů do kladně nabitého prostředí je nutno dodat energii (= vynaložit práci), analogicky to platí i pro přesun aniontů do negativně nabitého prostředí. Přesun kationtů do negativně nabitého prostředí a aniontů do kladně nabitého prostředí může probíhat samovolně.

Chemický potenciál, ve kterém hraje významnou úlohu elektrická složka, označujeme také jako *elektrochemický potenciál*.

Uvažme nyní, za jakých podmínek může docházet k difuzi iontu n z roztoku na vnější straně membrány, kterou si označíme jako strana a , do roztoku na vnitřní straně membrány (strana b). Je užitečné vyjít z podmínek rovnovážného stavu, kdy k difuzi nedochází. Pokud je membrána pro daný iont propustná, pak ve stavu rovnováhy musí být elektrochemický potenciál iontu n na obou stranách membrány shodný:

$$\mu_n^a = \mu_n^b$$

$$\mu_n^0 + RT \ln C_n^a + z_n F E^a = \mu_n^0 + RT \ln C_n^b + z_n F E^b$$

což lze upravit na tvar *Nernstovy rovnice*:

$$E^b - E^a = \frac{RT}{z_n F} \ln \frac{C_n^a}{C_n^b}$$

Rozdíl elektrických potenciálů na obou stranách membrány ($E^b - E^a$) se někdy také označuje jako *Nernstův potenciál* (E_N).

Pokud je dosažen na obou stranách membrány shodný elektrochemický potenciál příslušného iontu, vůbec to neznamená, že by také musela být na obou stranách membrány jeho stejná koncentrace. O tom se můžeme snadno přesvědčit po dosazení numerických hodnot konstant do Nernstovy rovnice. Pro jednomocný kationt ($z_i = 1$) a teplotu 25 °C (= 298,15 K) platí:

$$E_N [\text{V}] = 0,0257 \ln \frac{C^a}{C^b}$$

a po úpravě na dekadický logaritmus a pro napětí v milivoltech:

$$E_N [\text{mV}] = 59,2 \log \frac{C^a}{C^b}$$

Je tedy zřejmé, že desetinásobný rozdíl v koncentraci jednomocného iontu mezi oběma stranami membrány ($\log 10/1 = 1$) je úměrný rozdílu elektrických potenciálů o velikosti 59,2 mV mezi oběma stranami membrány. Pokud tedy je například uvnitř buňky (v cytosolu) desetkrát vyšší koncentrace iontů draslíku než ve vnějším prostředí, pak snížením elektrického potenciálu na vnitřní straně membrány na -59,2 mV se zcela kompenzuje vliv rozdílu v koncentracích na hodnotu celkového transmembránového elektrochemického potenciálu (bude nulová a nebude probíhat difusní tok). Při dalším snižování elektrického potenciálu v cytosolu pod uvedenou hodnotu dojde dokonce k difuzi K^+ z vnějšího prostředí do buňky, tedy do roztoku s desetinásobně vyšší koncentrací K^+ . Je zcela zřejmé, že velké transmembránové elektrické potenciály, které vznikají např. činností protonových pump, běžně přes 120 mV) mohou velmi podstatně napomáhat samovolnému toku (difuzi) iontů i proti koncentračnímu gradientu, tedy z míst o malé koncentraci do míst s koncentrací až stokrát vyšší. ***Při všech úvahách o ovlivňování transportu iontů (či jiných elektricky aktivních částic) určitou hodnotou elektrického potenciálu je potřeba mít stále na zřeteli jaká je polarita těchto částic, zda mají kladný či záporný náboj*** (viz spodní rámeček na předešlé straně).

Rozdíl v elektrických potenciálech roztoků oddělených biologickou membránou vzniká nejčastěji činností protonových pump (viz další kapitola). Může k němu ale docházet i v důsledku rozdílu ve schopnostech difuzního pohybu různých druhů iontů v dané membráně - ne všechny ionty totiž procházejí membránami stejně snadno. Až dosud jsme uvažovali o difuzi pouze jednoho druhu iontu (např. K^+), ale za normálních podmínek dochází v buňkách k difuzi více různých druhů iontů současně.

Představme si tedy případ, kdy na jedné straně membrány budeme mít roztoky disociovaných solí o jiné koncentraci než na straně druhé, ale počet opačně elektricky nabitých částic (kationtů a aniontů) bude v obou roztocích vyrovnán. Difuze bude zpočátku probíhat pouze pod vlivem koncentrační složky chemického potenciálu, neboť elektrická složka nebude významná. I za situace, kdy gradient koncentrací jednotlivých druhů iontů bude stejný, nemusí být stejná rychlost jejich difuze. Tuto rychlost totiž ovlivňuje také velikost iontů a jejich specifické interakce se složkami membrány. Všechny faktory které ovlivňují mobilitu iontu v membráně (kromě rozdílů v chemickém potenciálu!) shrneme do hodnoty *koeficientů permeability*. Ty jsou specifické pro jednotlivé druhy iontů a pro daný typ membrány.

Pokud existují rozdíly v koeficientech permeability mezi kationty a anionty v roztocích na obou stranách membrány, vede to k rozdílné rychlosti jejich toků přes membránu, k porušení elektroneutality roztoků, a tím i ke vzniku transmembránového elektrického potenciálu. Velikost tohoto potenciálu, který bývá označován jako E_M , lze vypočítat pomocí *Goldmanovy rovnice*. Na rozdíl od dříve uvedené Nernstovy rovnice jsou v ní koncentrace iontů na obou stranách membrány korigovány příslušnými koeficienty permeability (P). Ve velmi zjednodušené podobě (jeden jednomocný kationt n , jeden jednomocný aniont m na obou stranách membrány, které jsou opět označené jako a, b), ji můžeme psát:

$$E_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_n C_n^a + P_m C_m^a}{P_n C_n^b + P_m C_m^b}$$

Výpočet E_M pro více různých iontů je možný rozšířením počtu členů ve zlomku na pravé straně. Vliv vzniklého elektrického potenciálu na průběh transportních procesů i jiných iontů, které bychom k soustavě přidali, je evidentní, ovšem detailní popis těchto složitých procesů již přesahuje rámec našeho výkladu.

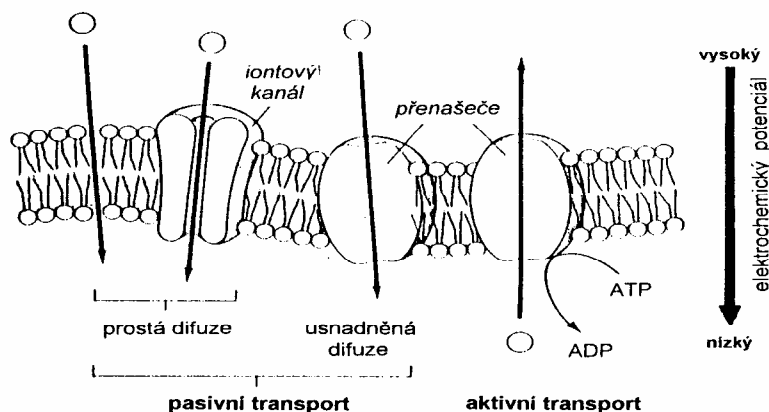
Koeficienty permeability malých jednomocných iontů pro difuzi plazmatickou membránou mají hodnotu řádově 10^{-9} m s^{-1} . Ionty s větší molekulovou hmotností a ionty divalentní jsou ještě mnohem méně pohyblivé.

Až dosud jsme se zabývali pouze otázkou difuzního toku iontů přes biologické membrány. Rychlost difuze v rostlinných buňkách však ovlivňují i jiné struktury, než jsou membrány. Jisté komplikace mohou způsobovat některé pevné látky (zejména v buněčné stěně), které snadno vytvářejí elektricky nabitě povrchy. Patří k nim například pektin a jiné makromolekuly, z jejichž karboxylových skupin disociují ionty vodíku. Struktury v buněčné stěně se tím stávají elektronegativní a mohou k sobě elektrostaticky vázat kationty solí. Elektricky nabitě povrchy v buňkách bývají označovány jako *Donnanova fáze* a elektrický potenciál mezi touto fází a okolním roztokem jako *Donnanův potenciál*. Donnanova fáze se vytváří i v cytoplazmě na povrchu velkých molekul proteinů a nukleových kyselin. Může zajistit ovlivňovat dynamiku difuzních výměn jednotlivých iontů, ovšem *pro celkovou rychlost toku za delší časový interval nemá rozhodující význam*.

Funkce transportních proteinů

A nyní se podívejme trochu podrobněji na *přenosové cesty* pro ionty a jiné rozpuštěné látky v buněčných membránách. Navíc k dosud uvedeným hybným silám transportu látek (elektrochemický potenciál u prosté difuze, tlakový rozdíl u hromadného toku) si přidáme ještě další, vycházející z vlastní metabolické energie buněk.

Jak již víme, základní fosfolipidová vrstva (*matrix*) membrán je prakticky nepropustná pro ionty a větší polární molekuly, stejně tak i pro molekuly organických látek. Jejich přestup přes membránu je možný pouze díky specializovaným transportním bílkovinám, které si můžeme rozdělit do několika skupin.



Schematické znázornění nejčastějších způsobů průniku různých molekul a iontů přes buněčné membrány.

Selektivní kanály jsou integrální (transmembránové) proteiny s možností měnit svoje prostorové uspořádání. Změna konformace není součástí transportního mechanismu, pouze ovlivňuje prostupnost kanálu, tedy *rychlost* transportu. Schematicky si to lze představit jako přivírání a otvírání regulační klapky, ovšem pravděpodobnější je představa proměnlivé šířky celého póru (kanálku), či rychlého střídání dvou konformačních stavů s otevřenou a zavřenou difuzní cestou, přičemž na frekvenci výskytu a souhrnné době stavu "otevřeno" závisí prostupnost kanálu. Vlastní výkonný protein selektivního kanálu je řízen celou řadou jiných odděleně umístěných membránových proteinů, které fungují jako selektivní příjemci signálů, Přijaté signály jsou od nich přenášeny řetězcem druhotných mediátorů (viz obrázek na str. 25). K významným signálům pro otvírání a zavírání kanálů patří zejména:

- *gradient elektrického napětí mezi oběma stranami membrány,*
- *vnější fyzikální podněty (záření, teplota, tlak na membránu aj.),*
- *chemické látky regulační povahy.*

Hustota selektivních (hlavně iontových) kanálů v buněčných membránách je sice velmi malá (řádově asi 100 na ploše 1 mm²), ovšem *jejich přenosová kapacita je neobyčejně vysoká* (asi 10⁶ až 10⁸ iontů za sekundu). K významným a vysoce selektivním iontovým kanálům v membránách rostlinných buněk patří kanály pro K⁺ a Ca⁺, z aniontů pak pro Cl⁻ a malát.

Transmembránové přenašeče (transportéry) jsou značně různorodou skupinou transportních bílkovin, které při své činnosti obvykle prodělávají vratné strukturální změny. Způsob vazby transportovaných částic k přenašečům a charakter vratných změn v jejich konformaci je dosud znám jen částečně. Obvykle se však nejedná o navazování transportované látky do nějakého komplexu a přesun tohoto komplexu na druhou stranu membrány, ale spíše přenášená látka migruje vytvořeným pórem s několika mezivazbami na stálých vazebných místech transportního proteinu.

Víme také, že u některých přenašečů je transport spojen se *spotřebou metabolické energie* (obvykle získané hydrolýzou ATP, vzácněji i z jiných, např. oxidačních reakcí). V tom případě se jedná o *aktivní transport* a příslušný přenašeč lze řadit mezi enzymy. Aktivní transport tak může probíhat zcela nezávisle na gradientu elektrochemického potenciálu přenášené látky.

Jistá skupina přenašečů však dodání energie pro svoji funkci nevyžaduje. Jde tedy o *pasivní transport*, který probíhá pouze ve shodě s gradientem elektrochemického potenciálu. Bývá také označován jako *zprostředkovaná* či *usnadněná difuze*. Na rozdíl od prosté difuze iontovým kanálem je tento typu transportu, byť z energetického hlediska pasivní, spojen s přechodným navazováním přenášeného iontu na transportní protein. Proto také transportní kapacita přenašečů je vždy podstatně menší, než u iontových kanálů (přibližně 10² až 10³ iontů za sekundu).

Nejčastějším případem aktivního transportu je činnost přenašečů využívajících energii z hydrolýzy ATP. Tyto transmembránové proteiny označujeme jako *adenosintrifosfatázy*, zkráceně *ATPázy*. Jsou hojnou součástí všech biologických membrán. Z hlediska příjmu iontů jsou zvláště důležité ATPázy cytoplazmatické membrány a tonoplastu. O zvláštěnostech ATPáz v membránách chloroplastů a mitochondrií si povíme v kapitolách o metabolismu.

V plazmatické membráně i v tonoplastu jsou asi vůbec nejhojnější ATPázy označované jako **protonové pumpy**, které transportují (s využitím energie ATP) vodíkový iont z jedné strany membrány na druhou, a to i z místa kde mají koncentraci (přesněji: elektrochemický potenciál) malý do míst s potenciálem vyšším. Tyto "pumpy" (jako ostatně i jiné ATPázy) netvoří jediná molekula bílkoviny, ale celý komplex se zřetelně asymetrickou stavbou: na užší "krček" pevně uložený v membráně, přiléhá kulovitá "hlavička", která již zcela vystupuje z roviny membrány.

Asymetrickou stavbou je dána i jednosměrnost transportu. Naprostá většina protonových pump transportuje vodíkové ionty z *cytosolu do buněčné stěny* (přes plazmalemu), a z *cytosolu do vakuoly* (přes tonoplast). Celý proces začíná zachycením molekuly ATP vystupující částí ATPázy a po její hydrolýze se vytváří volná cesta pro vstup protonu. Při rozštěpení jedné molekuly ATP je přes plazmalemu přenesen vždy jen *jeden proton*. ATPázy v tonoplastu jsou nejen rozměrnější, ale i energeticky efektivnější - na jednu molekulu ATP transportují *dva protony*. Jejich činnost také není závislá na přítomnosti draslíkových iontů, jako je tomu u ATPáz v plazmalemě, vyžadují však k aktivaci hořčík.

V membráně vakuol rostlinných buněk se nachází ještě další typ protonové pumpy, která k přenosu vodíkových iontů nevyužívá energii uvolněnou z ATP, ale z hydrolýzy anorganického difosfátu (= pyrofosfátu) na fosfátové ionty (*H⁺-difosfatáza*, dříve označovaná též jako *H⁺-pyrofosfatáza* či zkráceně *H⁺-PPáza*), která může po jistou dobu udržovat gradienty na membránách *i za kritického nedostatku ATP v rostlinné buňce*.

Činností protonových pump dochází k těmto zásadním změnám:

a) Vytváří se velký rozdíl v koncentraci vodíkových iontů mezi buněčnou stěnou, cytosolem a vakuolou. Hodnota pH buněčné stěny i vakuolárního roztoku obvykle klesá na 5,5 až 5, zatímco v cytosolu se zachovává přibližně neutrální reakce (pH 7,0 až 7,5), neboť jsou tam přítomny látky se značnou ústojnou (pufrovací) schopností. Větší koncentrace vodíkových iontů v buněčné stěně a ve vakuole současně znamená i jejich vyšší chemický potenciál v těchto kompartmentech než v cytosolu.

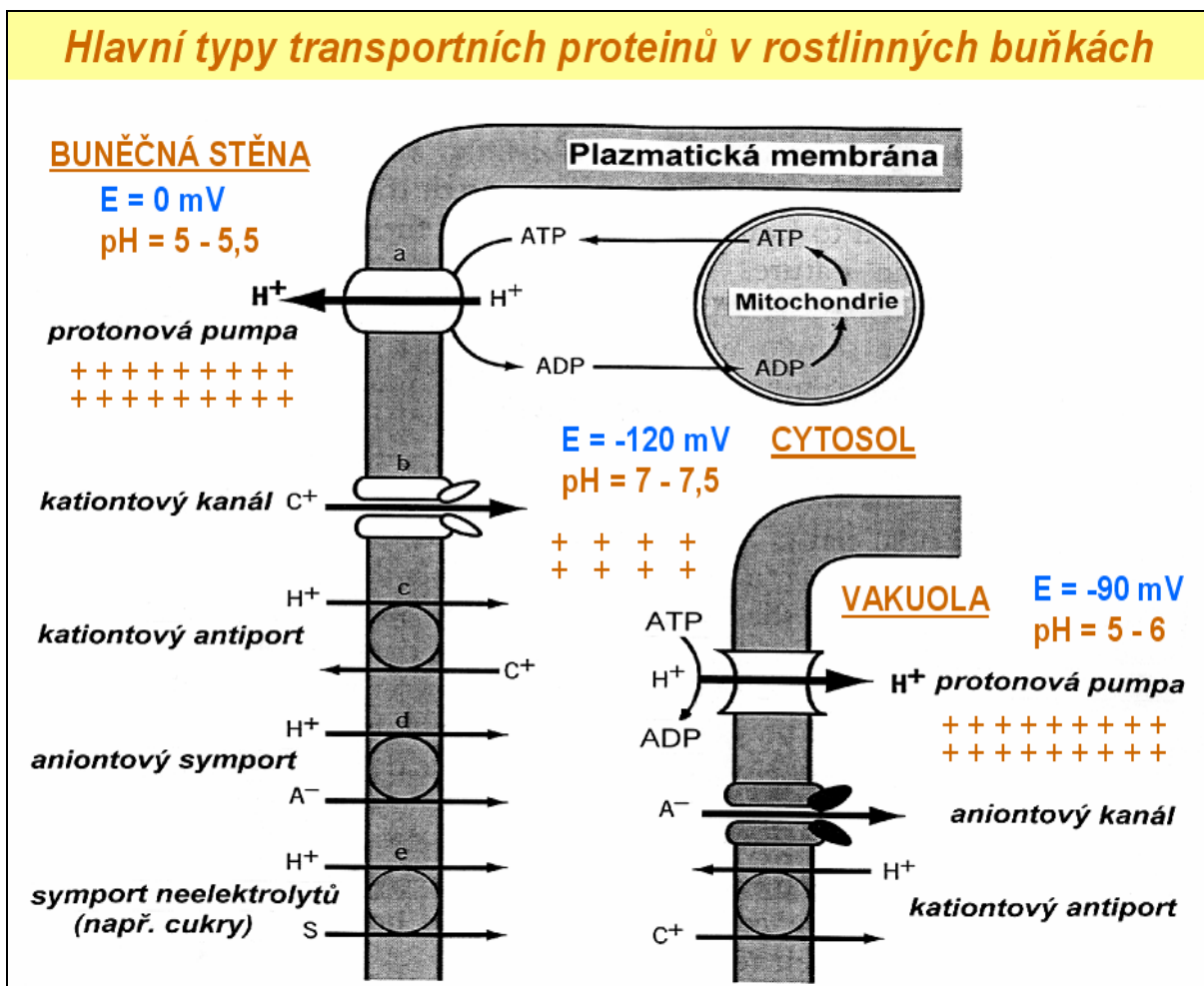
b) Dochází ke zvýšení membránového elektrického potenciálu, neboť v cytosolu je méně kationtů a je tedy negativnější než buněčná stěna a roztok ve vakuole. Proto se tento typ ATPáz označuje jako *elektrogenní*.

Vytvořený rozdíl v elektrickém potenciálu a rozdíl v chemickém potenciálu vodíkových iontů má zcela zásadní význam pro transport mnoha dalších iontů přes buněčné membrány, jak uvidíme z následujícího výkladu.

Spřažený transport a kinetika výměn pomocí přenašečů

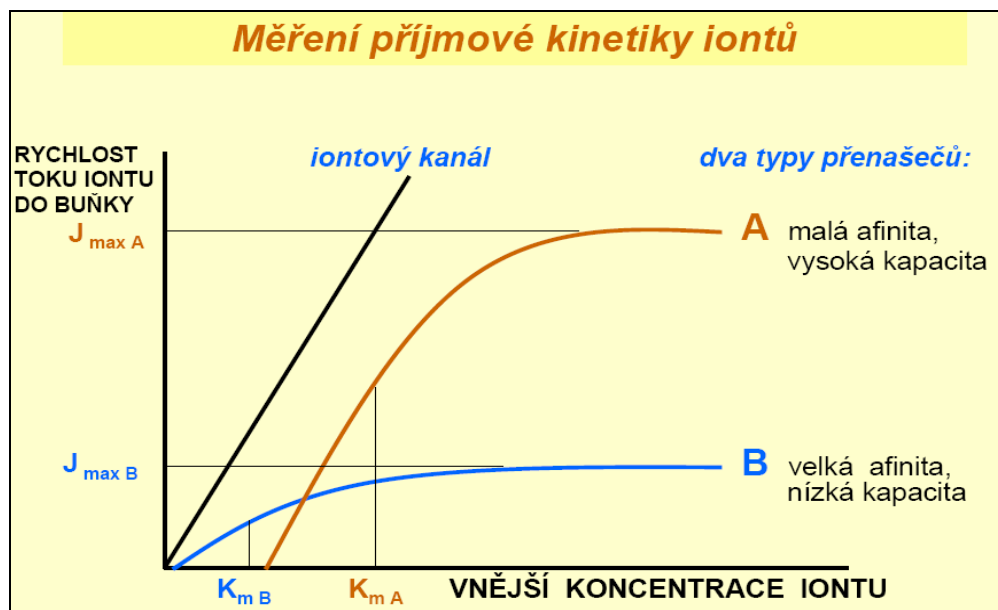
Vlivem rozdílů v pohyblivosti kationtů a aniontů při difuzi přes biologické membrány, ale zejména v důsledku činnosti protonových pump je cytosol vždy negativněji nabitý než jeho okolí (tedy roztoky v buněčné stěně a ve vakuole). Vzhledem k takto orientovanému rozdílu elektrického potenciálu jsou vytvořeny velmi příznivé podmínky pro pasivní transport kationtů z okolí do cytosolu, a to buď pomocí selektivních iontových kanálů (prostá difuze), nebo pomocí přenašečů pasivního typu (usnadněná či zprostředkovaná difuze). Nikterak to ale nevylučuje i spoluúčast aktivního transportu pomocí přenašečů.

Transport aniontů stejným směrem (z okolí do cytosolu) či kationtů opačným směrem (z cytosolu do okolí) však pasivním způsobem obvykle není možný. Transport v tomto případě lze uskutečnit pouze pomocí aktivních přenašečů, tedy za dodání jistého množství chemické energie. Při transportu aniontů do buňky (či z cytosolu do vakuoly) není možné dodávat chemickou energii přímo hydrolýzou ATP v příslušném aniontovém přenašeči, ale nejčastěji se využívá energie pomocného, současně transportovaného iontu, jehož chemický potenciál byl zvýšen dříve uskutečněnou metabolickou reakcí. V tom případě hovoříme o **sekundárním aktivním transportu**. Jako pomocné ionty v těchto společných (spřažených) transportech figurují nejčastěji protony. Je přitom využít jejich vyšší chemický potenciál na vnější straně plazmalemy a ve vakuole, vytvořený transportní ("zahušťovací") činností vodíkových pump. Vodíkové ionty za vyšší koncentrace a v „kladněji“ nabitém prostředí (= s vysokým elektrickým potenciálem) mají vyšší chemický potenciál než ve zředěném stavu a v prostředí se sníženým elektrickým potenciálem. Zvýšení jejich chemického potenciálu je tedy dáno jak koncentrační, tak i elektrickou složkou. Při transportu aniontů z vnějšího prostředí přes plazmalemu do cytosolu jsou protony transportovány stejným směrem (přičemž přenašečem prochází současně vždy jeden aniont a jeden či několik protonů), což se označuje jako **symport**. Je však možné využít přebytek energie vodíkových iontů k energetické dotaci transportu jiného iontu současně pronikajícího tímtož přenašečem opačným směrem (**antiport**). *Spřažený transport je v rostlinných buňkách neobyčejně hojně využíván pro výměny nejen iontů minerálních živin, ale i nízkomolekulárních organických látek (elektrolytů i neelektrolytů, např. organických kyselin, cukrů, adenylátů, aj.) mezi cytosolem a okolím buňky či mezi cytosolem a buněčnými organelami.*



Studium funkce transportních proteinů – metody, nové poznatky

Studiem kinetiky příjmu jednotlivých iontů, např. měřením rychlosti příjmu za různé koncentrace ve vnějším prostředí, můžeme podle tvaru zjištěných závislostí rozlišit transport pomocí přenašečů (saturační typ křivky, rychlost transportu může dosáhnout jen jisté hodnoty, kterou nelze překročit) od prosté difuze (vzestupné křivky bez zřetelného nasycení). Tato měření se provádějí s buňkami či celými kořeny s předem navozeným nedostatkem zkoumaného iontu. Rozlišit pasivní transport od aktivního lze na základě srovnání teoretické hodnoty rychlosti a směru difusního toku (vypočítané z gradientu chemického potenciálu příslušného iontu) a porovnáním této hodnoty s experimentálně zjištěnými rychlostmi toku či s koncentracemi v ustáleném stavu.



Studium transportních procesů na buněčné úrovni je nesmírně obtížné. Nejen proto, že studovaný iont může být současně transportován oběma směry a navíc různým mechanismem (aktivně i pasivně), ale může být také kontinuálně odváděn do různých buněčných struktur, či přímo v cytosolu vázán do chemických sloučenin. Velké potíže vyplývají z proměnlivosti biologických membrán a z možnosti regulace jejich struktury a funkce, kterou buňka má. Životnost transportních proteinů je velmi krátká (obvykle jen několik dní), jsou tedy ve stálé obměně. Jejich počet se může rychle měnit podle okolností (naléhavost potřeby určitého iontu pro buňku, vnější koncentrace iontů, aj.).

Velký pokrok ve výzkumu transportu iontů přes buněčné membrány byl umožněn zavedením metody označované anglickým termínem "*patch clamp*". Při této metodě se ústí velmi tenké kapiláry přisaje na studovanou membránu a za různých experimentálně navozovaných podmínek se pak studují její vlastnosti. Je dokonce možné opatrnou manipulací s kapilárou vytrhnout kousek přisáté membrány a v umělém prostředí zkoumat funkce jednotlivých transportních proteinů. Ještě významnější jsou v současné době některé aplikace metod molekulární biologie, vycházející ze znalosti genů kódujících jednotlivé transportní proteiny a v přenosu genetické informace do buněk jiných organismů, v nichž se tyto proteiny nevyskytují. Tedy např. cRNA zkoumaného transportního proteinu je pomocí vhodného vektoru vpravena do vajíčka žaby *Xenopus laevis*, a funkce vytvořeného transportního proteinu jsou zkoumány pomocí elektrofyziologických a izotopových metod.

Nicméně ani uvedené moderní metody nepostačovaly k detailnímu objasnění vlastního transportního mechanismu jednotlivých transportních proteinů, zejména pak jakým způsobem je zajištěna *selektivita* transportu, tedy například proč procházejí otevřeným pórem

v draslíkovém kanálu jen ionty draslíku a nikoli také třeba velmi podobné (dokonce o něco menší) ionty sodíkové. K řešení těchto problémů již nepostačují biochemické či molekulárně biologické metody studia struktury jednotlivých transportních proteinů po jejich separaci z membrán (i to je velmi pracné!), neboť jejich správná konformace a tím i funkčnost je možná jen při jejich přirozeném uložení v membráně. Zde je tedy potřeba aplikovat nedestruktivní biofyzikální metody, např. rentgenovou krystalografii.

Nové poznatky, za které vděčíme zejména pracovním skupinám amerických badatelů (Peter Agre a Roderick MacKinnon, oba získali za svoje objevy Nobelovu cenu v roce 2003), se týkají především vysvětlení struktury a funkce iontových kanálů a akvaporinů. Jak je patrné z níže uvedených obrázků, ionty vstupují do kanálu v hydratovaném stavu, ovšem v úseku transportní cesty, označovaném jako „filtr selektivity“, molekuly vody se odpojují. Místo hydratace nastupuje dočasná elektrostatická vazba iontu k aminokyselinovým zbytkům transportního proteinu. Ionť je propuštěn kanálem jen v tom případě, že dojde k dokonalé shodě vazebných sil mezi ním a aktivními body ve filtru selektivity, jejichž prostorové uspořádání je specifické pro každý typ iontového kanálu:

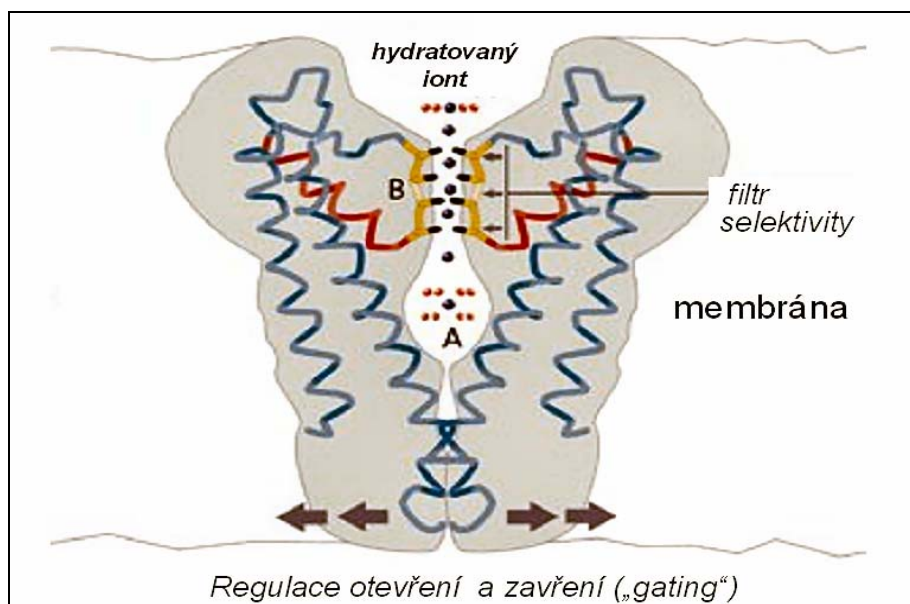
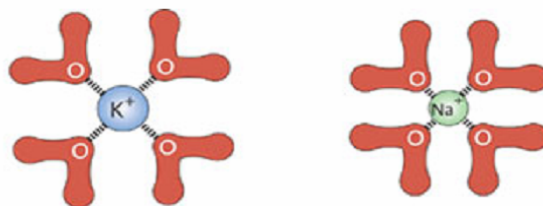
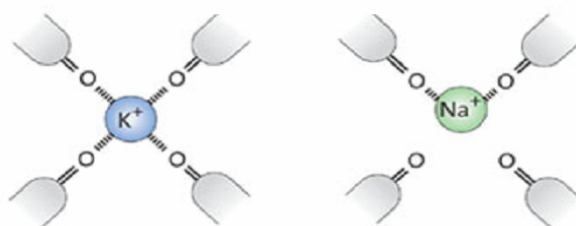


Schéma funkce filtrů selektivity v iontových kanálech

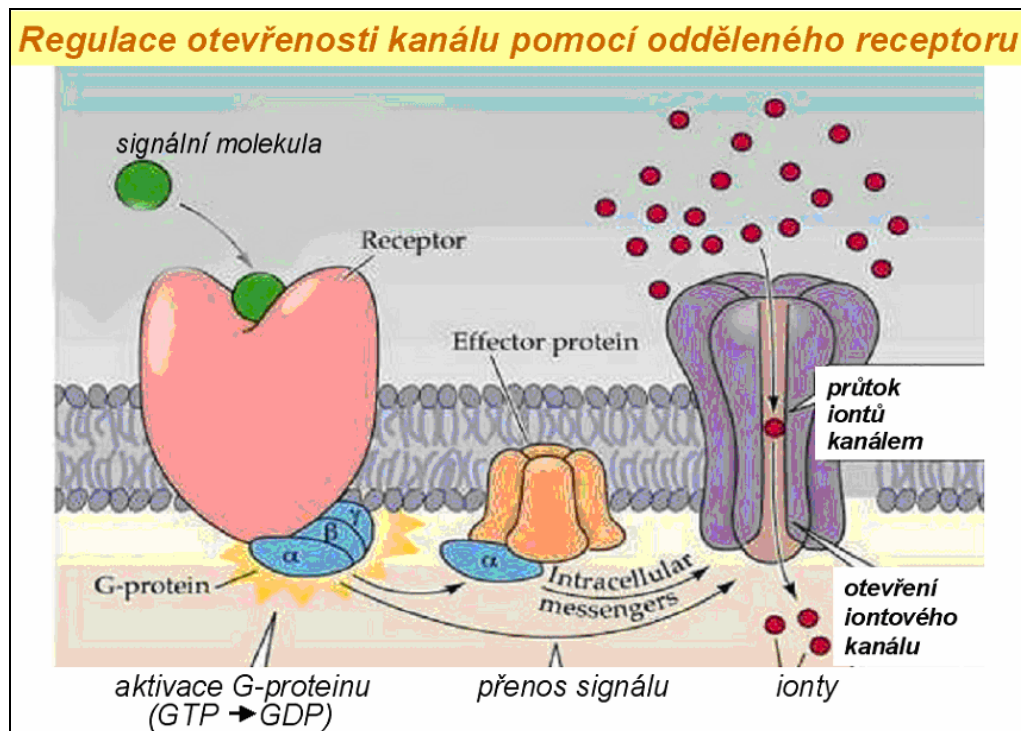
a) Kationty v hydratovaném stavu (mimo iontový kanál):



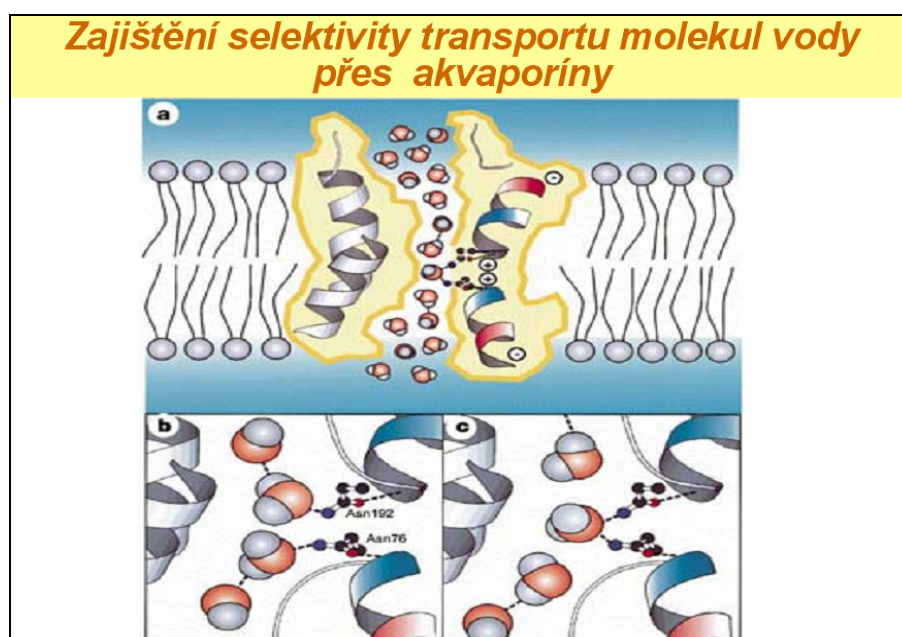
b) Vazba kationtů ve filtru selektivity draslíkového kanálu:



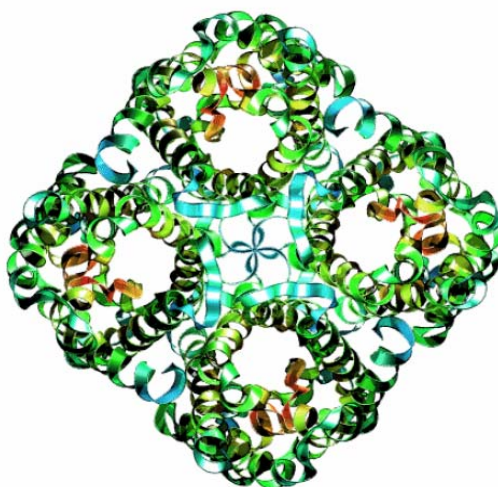
Dalším intenzivně zkoumaným problémem je mechanismus zajišťující *otvírání a zavírání* iontových kanálů (angl. *gating*), o kterém již byla zmínka. Jde zejména o podrobné poznání různých cest přenosu signálu od receptorových proteinů k iontovému kanálu. Jedna z možností je naznačena na následujícím obrázku:



Způsob zajištění selektivity při transportu molekul vody **akvaporíny** byl také dlouho zcela nejasný. Dnes již víme, že tyto transportní proteiny mají filtr selektivity poněkud odlišný od filtrů v iontových kanálech. Akvaporíny propustí pouze ty molekuly, které jsou schopny se dočasně spojit ve stísněném hydrofobním úseku póru s aminokyselinovými zbytky pomocí *vodíkových můstků*, a které navíc mohou být donorem i akceptorem této vazby. Celý mechanismus je již znám velmi podrobně, a je pochopitelně značně složitější, než jak je schematicky znázorněno na přiloženém obrázku:



Výzkumu akvaporínů je v současné době věnována mimořádná pozornost jak v rostlinné, tak i v živočišné fyziologii, neboť se zjistilo, že jich existuje v každém organismu celá řada typů, a že jsou jisté odlišnostmi nejen ve struktuře, ale i v regulaci jejich tvorby a funkce. Genů kódujících tyto transportní proteiny je známo několik desítek. V membránách se obvykle vyskytují v tetramerních shlucích, ovšem každá ze čtyř částí je samostatnou funkční (transportní) jednotkou. V jednom shluku se nemusí vždy vyskytovat totožné proteiny. Je také zajímavé, že zatímco v živočišných buňkách fungují akvaporíny jako pravé *poríny* (tedy s trvale otevřeným transportním kanálkem), u rostlin mají schopnost se za jistých okolností uzavírat. Dokonce jsou známy dva možné mechanismy vedoucí k jejich zavření: (1) pod vlivem nedostatku vody v buňce či za vysoké teploty dochází k defosforylaci určitého serinového zbytku (a v důsledku toho pak k zavření kanálku), (2) při anaerobním stresu (při zaplavení kořenů) zprostředkovává zavírací reakci protonace jednoho histidinového zbytku.



Tetramerní struktura akvaporínů

Transmembránový transport organických látek

Uvnitř buňky i mezi buňkami panuje čilá výměna nejen vody a iontů solí, ale i větších organických molekul, včetně proteinů. Tomu musí odpovídat i dokonale fungující transportní systémy, které ale mohou být velmi odlišné nejen u různých vnitrobuněčných struktur, ale i u různých typů buněk.

Transport proteinů je zvláště významný u organel. Velké množství proteinů, které buněčné organely obsahují ve svých vnitřních strukturách, a které ještě navíc potřebují neustále obměňovat, není totiž syntetizováno jejich vlastním aparátem. Především do chloroplastů a mitochondrií musí být velké množství (často více než 50%) proteinů transportováno přes dvojitou membránu z cytosolu. Také přes tonoplast a cytoplazmatickou membránu je transportována řada složitých organických molekul.

Transport proteinů přes specifické aktivní přenašeče v membránách je možný pouze v nesloženém (lineárním) tvaru. K udržení nesložené struktury před vlastním transportem a naopak k vytvoření složené funkční konformace molekuly proteinu po transmembránovém transportu je nutná spoluúčast specifických pomocných proteinů označovaných jako *chaperony*, které se dočasně navazují na transportovaný protein. Udivující je specifita vazby (je nutné rozlišovat mezi stovkami různých proteinů) a přitom u transportních proteinů v membránách chloroplastů a mitochondrií nebyly zjištěny žádné glykoproteiny, jejichž polysacharidové řetězce tuto rozlišovací schopnost u jiných membrán zajišťují. Transport proteinů (i jiných látek) mezi organelami uvnitř buňky je neobyčejně zrychlován prouděním cytoplazmy a váčkovým přesunem na vláknech cytoskeletu.

Transport cukrů (zejména sacharózy) a dalších nízkomolekulárních organických látek (aminokyselin, amidů, bezdušíkatých organických kyselin, atd.) přes biologické membrány se děje nejčastěji spřaženým transportem s vodíkovými ionty ve specifických přenašečích. Tento sekundárně aktivní transport může být za vysokých koncentrací příslušné látky provázen i pasivním transportem. Zdaleka ne pro všechny metabolity ale musí být v buněčných membránách vhodné transportní proteiny - někdy je nutný rozklad složitějších na jednodušší, transportovatelné složky a jejich resyntéza na opačné straně membrány. V některých případech jsou sice v membránách transportní proteiny pro daný metabolit, ale transport je možný pouze v jednom směru, což obvykle má svoje opodstatnění.

Transmembránový **transport sekundárních metabolitů**, jako např. flavonoidů, anthokyanů, rozkladných produktů asimilačních barviv, alkaloidů a mnoha dalších sloučenin, využívá zvláštní transportní proteiny označované jako *ABC přenašeče* (angl. *ATP - Binding Cassette transporters*). Jedná se o primárně aktivní transport, přímo využívající ATP jako zdroje energie (nikoli tedy zprostředkovaně přes tvorbu protonového gradientu). Výzkum mechanismu přenosového procesu u transportních proteinů tohoto typu u rostlin je však teprve v začátcích.

Radiální a xylémový transport iontů solí

Jako radiální transport iontů v kořenech označujeme jejich tok od epidermis až po xylém. Tento tok probíhá stejně tak jako u vody souběžně symplastem i apoplastem, s výjimkou prostupu přes endodermis a exodermis, kde se oba proudy dočasně spojují. Za nízkých koncentrací iontů obvykle převažuje symplastový tok. Jeho rychlost je asi 10 až 60 mm za hodinu, což je podstatně více než rychlost prosté difuze za takového koncentračního spádu, který může v buňkách vzniknout. K rychlejšímu radiálnímu transportu přispívá proudění cytoplazmy. Zrychlený tok vody v apoplastu či symplastu za silně výparných podmínek může také výrazně napomáhat transportu iontů solí.

V celém úseku transportu napříč kořenem jsou zřejmě **dvě klíčová místa**: jednak při *vstupu iontů do symplastu* (nejčastěji přes plazmatickou membránu buněk pokožky), a potom *vstupu iontů do vodivých elementů xylému* z parenchymových buněk středního válce sousedících s xylémem. Tedy, jinými slovy, jde o vstup a výstup iontů přes membrány symplastu.

Ty ionty, které již v epidermis vstoupily přes plazmalemu do cytosolu, mohou procházet buňkami kůry a středního válce pomocí plazmodezmat, tedy bez přestupu cytoplazmatické membrány dalších buněk. Tento symplastový transport však nutně končí u vodivých elementů xylému, které, jakožto mrtvé struktury, nemají spojení se sousedními buňkami pomocí plazmodesmat. Ionty zde tedy musí podruhé být transportovány přes plazmatickou membránu. V xylému bývá koncentrace solí velmi nízká, a proto při tomto transportu jsou podmínky téměř opačné, než tomu bylo při příjmu z půdního roztoku. Vlastnosti plazmalemy parenchymových buněk hraničících s xylémem musí být tudíž podstatně odlišné od vlastností plazmalemy buněk epidermis a kůry. Existují také důkazy, že regulační signály ovlivňující činnost iontových kanálů a přenašečů v membráně epidermis neovlivňují činnost transportních proteinů v membránách přiléhajících ke xylému. Ty mají zřejmě svůj vlastní regulační mechanismus.

Podélný (xylémový) transport iontů solí v cévách a cévicích je již vcelku méně zajímavý. Ionty, stejně tak i některé organické látky transportované z kořenů do nadzemních částí (zejména aminokyseliny), jsou unášeny proudem vody, a tudíž rychlost jejich transportu je zcela závislá na rychlosti toku vody. Stěny cév mají sice mírně negativní náboj a tudíž zde může docházet k elektrostatické vazbě části kationtů. Protože však tato vazba je poměrně slabá a rychle saturovatelná, nemá z dlouhodobějšího hlediska na vedení iontů vliv.

Transport látek v lýku (floému)

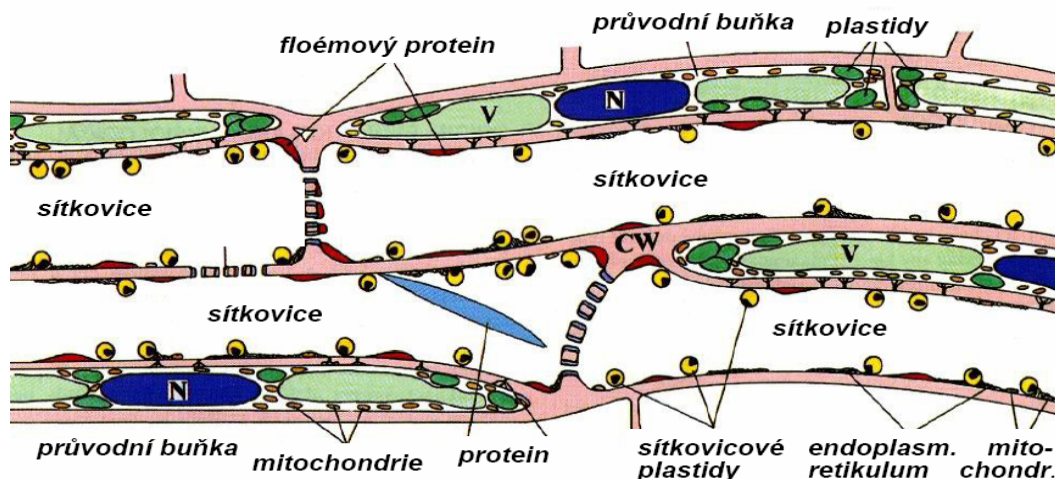
Kromě rychlého dálkového rozvodu roztoků v xylému má rostlina ještě další výkonný a na xylému nezávislý transportní systém - **lýko (floém)**. Stavba i funkce floémové soustavy je zcela odlišná od xylému a proto představa, že hlavní rozdíl mezi těmito dvěma soustavami je jen ve směru proudění (xylémem vzhůru a lýkem dolů), je krajně nesprávná. Jak již víme, xylémový tok probíhá v mrtvých strukturách na základě působení fyzikálních sil a má prakticky vždy vzestupný směr.

Floémová transportní soustava obousměrně propojuje všechny orgány rostliny a je proto mnohem univerzálnější než xylémový transport. Tok v lýku má rostlina pod velmi dokonalou kontrolou, neboť je úzce vázán na metabolické procesy.

Lýko je tvořeno dlouhými řetězci živých, avšak bezjaderných buněk, **sítkovic**. Jsou navzájem spojeny hustě proděravělými buněčnými stěnami, označovanými jako sítko. Délka sítkovic je přibližně čtvrt až půl milimetru, pouze u nahosemenných bývají delší (1,5 mm). Při vzniku dospělé sítkovice nejen degeneruje jádro, ale mizí i vakuoly a plazmatická membrána v oblasti sítek.

K sítkovicím přiléhá jednak lýkový parenchym, a jednak zvláštní **buňky průvodní**, které jsou se sítkovicemi propojeny hustou sítí plazmodezmat a tvoří s nimi vlastně jeden funkční celek. Na rozdíl od sítkovic mají průvodní buňky vysokou metabolickou aktivitu (často vyšší než buňky v meristémeh!). U některých skupin druhů, zvláště z čeledi hvězdicovitých (*Asteraceae*) a bobovitých (*Fabaceae*), mají průvodní buňky zvlněný (tedy i zvětšený) povrch plazmatické membrány, což lze považovat za důkaz jejich velkého významu pro komunikační spojení lýka s okolními pletivy (laterální transport).

Uvnitř sítkovic, kromě nástěnné cytoplazmy, bývají nápadná vlákénka bílkoviny, označované jako *P-protein*, která se obvykle shlukují v oblasti sítek. Funkce této bílkoviny je stále velmi záhadná. Vzhledem k tomu, že má snadnou schopnost koagulace, může rychle utěsnit otvory v sítku v případě poranění a zabránit tak výtoku cenné floémové tekutiny. Do jaké míry může sloužit také jako regulátor průtoku, eventuálně jako součást obranného mechanismu proti patogenům, není dosud jednoznačně dokázáno.



Stavba sítkovic a jejich těsná vazba na průvodní buňky v lýku.

Složení roztoků transportovaných ve floému je nejen druhově specifické, ale mění se i v závislosti na rychlosti růstových a metabolických procesů. Vždy však převažují neredukující cukry, z nichž bývá nejhojnější *sacharóza*. Její koncentrace může dosahovat až 150 g l^{-1} . Dále bývají hojně zastoupeny aminokyseliny (až 15 g l^{-1} , zejména kyselina glutamová, asparagová a serin) i jiné organické kyseliny, ale také např. ATP a fytohormony. Ve floémové šťávě lze často zjistit i ionty anorganických solí (např. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Sítkovice se udržují ve funkčním stavu zřídka déle než jednu vegetační sezónu, pokud ovšem je zachována kambiální aktivita. Ve starých nefunkčních sítkovicích se hromadí polysacharid *kalóza*, který slouží k jejich dokonalému utěsnění. Kalóza může být produkována i v mladých funkčních sítkovicích, a to jednak při jejich poranění, ale i v důsledku působení některých stresových faktorů (např. za vysoké teploty).

Popis vlastního *mechanismu floémového toku* lze rozdělit na tři hlavní otázky:

- (1) co je *hybnou silou* celého toku,
- (2) jakým způsobem je řízen *vstup* látek do sítkovic (tzv. naplňování zdrojové části lýka),
- (3) jakým způsobem je řízen *výstup* („odběr“) látek ze sítkovic na místě jejich potřeby.

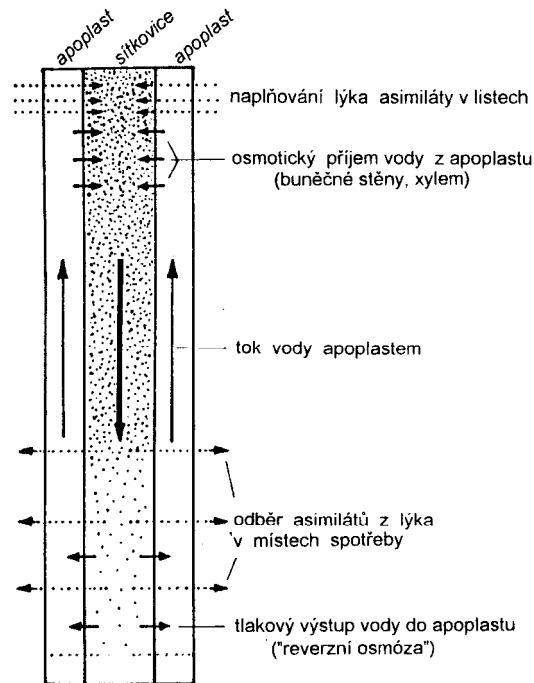
Z vysokých rychlostí floémového toku (přibližně 1 m h^{-1}) je zřejmé, že nemůže jít o prostou difuzi ani o přenos zrychlený prouděním cytoplazmy, který je běžný v jiných symplastových strukturách, neboť jeho rychlost bývá jen několik centimetrů za hodinu. Skutečnost, že lýko je tvořeno živými buňkami, vedla k intenzivnímu zkoumání dalších možností *aktivního transportu* v lýku, energeticky zásobeného především z průvodních buněk po celé délce floémové soustavy. Vycházelo se přitom z domněnky, že transport přes otvory v sítkách (po jejich vyplnění P-proteinem) může probíhat pouze za dodávání metabolické energie. Tato domněnka se nepotvrdila. Bylo naopak prokázáno, že u funkčních sítkovic jsou u většiny druhů rostlin sítky natolik volné, že umožňují hromadný tok. V neprospěch uvedené představy aktivního transportu svědčí také skutečnost, že uměle navozená inhibice metabolismu sítkovic a průvodních buněk (např. nízkou teplotou či chemickým blokováním enzymů ve stonku a v řapících listů, ne však v oblasti zakončení lýka!), nemá obvykle větší vliv na rychlost toku.

V současné době se pro vysvětlení mechanismu transportu roztoků v lýku uznává jako nejpravděpodobnější *teorie tlakového toku*, která byla vypracována již ve dvacátých letech tohoto století, a od té doby bylo nasbíráno hodně důkazů na její podporu. Podle této teorie není nutné uvažovat o aktivním podílu všech sítkovic na transportu. Hromadný tok je dán tlakovým rozdílem mezi začátkem a koncem celé transportní cesty. Rozdílného tlaku je dosaženo *propojením odlišných osmotických systémů*. Ten první je umístěn u zdroje asimilátů (tedy obvykle v listech) a druhý na místech jejich spotřeby (v kořenech a v jiných energeticky nesamostatných orgánech či úložištích asimilátů). Asimiláty se hromadí ve zdrojovém zakončení floému, což je provázáno osmotickým vtokem vody do sítkovic ze sousedních buněčných stěn, které jsou napájeny xylémovým proudem. Vzniklý tlak (až 2,5 MPa) vede k toku tekutin na opačnou stranu floémových drah, kde je tlak nižší. V tomto druhém osmotickém systému dochází k výstupu rozpuštěných látek i vody. Výstup vody je dán vyšším vodním potenciálem vody v sítkovicích ve srovnání s vodou v apoplastu, a je nutnou podmínkou udržení stálého toku. V místech největšího odběru cukrů z floému se udržuje jejich poměrně vysoká koncentrace v apoplastu, což vede nejen ke tlakově, ale i osmoticky podmíněnému výstupu vody ze sítkovic. Část asimilátů je odebírána z lýka i v průběhu toku. V lýku se tedy udržuje stálý spád koncentrace osmoticky aktivních látek i spád hydrostatického tlaku od zdrojové části (začátek transportu) po místa spotřeby (zakončení transportu).

Rychlost floémového toku závisí v prvé řadě na fungování osmotického systému v listech (= u zdroje asimilátů). Výkon tohoto systému je dán rozdílem vodního potenciálu mezi symplastem (koncentrovaný roztok na začátku floému) a apoplastem (zředěný xylémový roztok v buněčných stěnách).

Popsaná teorie tlakem řízeného toku má i svoje slabá místa, která čekají na vysvětlení. V prvé řadě není jasné, proč jsou vodivé elementy lýka *živé* buňky s komplikovanou stavbou sítek, když pro čistě tlakový mechanismus transportu by lépe vyhovovaly mrtvé buňky, jak je tomu u xylému.

Nejsme si také zatím jisti, zda tlakovou teorií lze vysvětlit floémový tok u nahosemenných (*Gymnospermae*). U této skupiny rostlin bývají sítky v sítkovicích pravidelně potažena membránami typu hladkého endoplazmatického retikula a není tedy vůbec jasné, zda a do jaké míry je vůbec možný hromadný tok.



Znázornění hlavních rysů teorie tlakového toku tekutin v lýku v důsledku součinnosti dvou osmotických systémů (blíže viz text).

Naplňování lýka (angl. *phloem loading*) je proces při kterém dochází k hromadění cukrů a dalších látek ve floému v blízkosti asimilujících buněk mezofylu do koncentrace, která je *podstatně vyšší (až 40x) než v okolních buňkách zdrojového mezofylu*. Tento proces zůstával po dlouhou dobu nevysvětlen. Na první pohled bylo zřejmé, že se sotva může jednat o transport čistě symplastovou cestou (přes plasmodesmata až do sítkovic), neboť v tom případě by nebylo možné zachovat tok rozpuštěných látek z nižší koncentrace do vyšší. To lze zajistit jen při energeticky dotovaném aktivním transportu přes membrány. Membránový transport cukrů se děje symportem s H^+ ionty, které jsou zpětně přenášeny protonovými pumpami. Uvažovalo se tedy, že symplast lýka (sítkovice s průvodními buňkami) není propojen s okolním mezofylem plně funkčními plasmodesmaty, a že ze symplastu mezofylu přestupují cukry (převážně sacharóza) přes plazmalemu do apoplastu (do buněčné stěny a do mezibuněčných prostor) a odtud, opět přes membránu, do průvodních buněk a sítkovic (tzv. **apoplastová cesta** naplňování lýka).

Novější výzkumy dokázaly, že k tomu tak skutečně u velkého počtu druhů rostlin dochází, ale zdaleka ne u všech. U některých taxonomických skupin rostlin (zejména evolučně starších, včetně mnoha druhů stromů a keřů) nebyl prokázán přestup cukrů do apoplastu, ale pouze přímý tok plasmodesmaty z mezofylových buněk až do lýka, který, jak jsme již naznačili, by teoreticky neměl být možný. Tato čistě **symplastová cesta** je ovšem podmíněna jedním zásadním požadavkem: transportovaná sacharóza se musí v průvodních buňkách lýka přetvořit na složitější cukry s větší molekulou (např. na rafinózu či stachyózu), jejichž transport plasmodesmaty zpět do mezofylových buněk není možný. Jedná se tedy o jakousi „*polymerační past*“, která umožňuje hromadění cukrů v lýku i bez účasti aktivního transmembránového transportu. Významnou úlohu zde ovšem také hrají strukturální a funkční

vlastnosti plasmodesmat, které musí být schopny účinně zabránit zpětnému transportu molekul rafinózy.

Apoplastová cesta naplňování lýka

Hlavní znaky apoplastové cesty

- buňky lýka nejsou spojeny s okolními buňkami pomocí plasmodesmat,
- průvodní buňky lýka mají zvětšený povrch a velkou hustotu transportních proteinů pro sacharózu v plazmatické membráně (symport s H^+),
- má vysokou kapacitu transportu (i za chladu a jiných stresových stavů),
- vyskytuje se u evolučně mladších taxonomických skupin rostlin.

Symplastová cesta naplňování lýka

Hlavní znaky symplastové cesty:

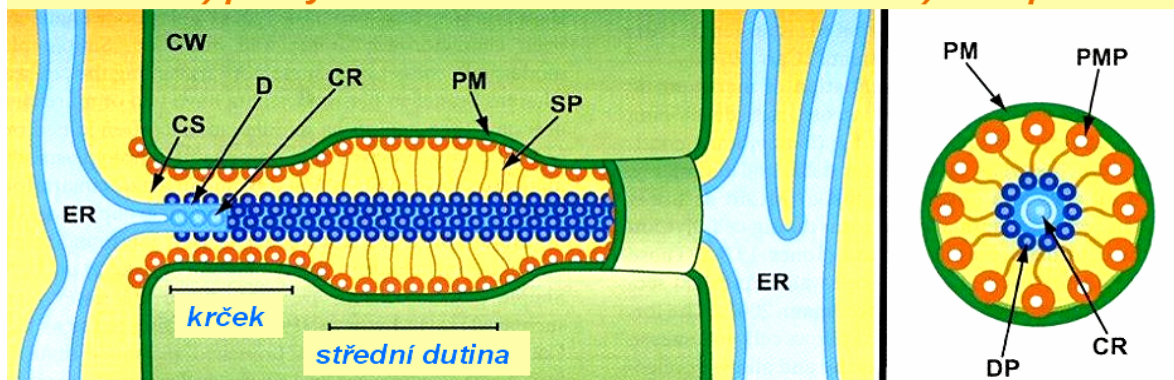
- hojná plasmodesmata na rozhraní mezofyl - lýko, která jsou propustná jen pro malé molekuly,
- udržování nízké koncentrace sacharózy v lýku (a tím i koncentračního spádu pro transport z mezofylu) rychlou konverzí do složitějších cukrů (rafinóza, stachyóza, manitol),
- vytvořené složitější cukry nemohou projít přes plasmodesmata zpět do mezofylu, proto zůstávají v lýku („polymerační past“),
- má poměrně malou transportní kapacitu, je citlivá na chlad,
- vyskytuje se hlavně u evolučně starších druhů rostlin (řada druhů stromů, keřů a teplomilných bylin).

Stavba a funkce plasmodesmat je v současné době intenzivně studována, neboť jejich zmíněné schopnosti selektivní regulace mezibuněčného transportu látek byly sice mnohokrát pozorovány, ale chybělo vysvětlení možného *mechanismu*. Dnes již víme, že regulační schopnosti má především oblast krčku – depolymerací aktiniových vláken se může zvýšit průměr transportovaných částic z běžných 1,5 - 2 nm až na 10 nm (tedy pak projdou molekuly až do velikosti 20 kDa!), ovšem na druhé straně je možné silné přivření až zavření kanálu v oblasti krčku. Navíc právě tam byla dokázána přítomnost zvláštních proteinů, které mohou hrát roli selekčních filtrů vylučujících z transportu některé látky.

Schéma vnitřní stavby plasmodesmat

a) příčný řez

b) čelní pohled



ER – endoplazmatické retikulum, **D** – desmotubulus, **PM** – plazmatická membrána, **CW** – buněčná stěna, **CS** – cytoplazmový rukáv, **DP** – proteiny desmotubulu, **CR** – střední váleček, **PMP** – proteiny vázané na PM, **SP** – příčné výběžky.

Směrování transportu a výstup látek z lýka jsou v současné době intenzivně studované procesy, a to zejména pro jejich možné praktické využití. Pokud bychom například dokázali vhodnými zásahy (chemickými regulátory, genovou manipulací) lépe usměrňovat toky asimilátů do zásobních orgánů či do semen zemědělsky významných plodin, mělo by to nepochybně velký význam pro zvýšení jejich výnosů. Bohužel tak daleko ještě nejsme, protože naše základní poznatky o regulačních mechanismech floémového transportu jsou stále nedostatečné.

Již dosti dlouho bylo známo, že z téhož místa (např. z určitého listu) mohou být jednotlivé typy sloučenin, současně vstupující do lýka, transportovány do odlišných orgánů. Tedy např. sacharóza převážně do kořenů, aminokyseliny do mladých listů, atd. Pozdější přesná měření ale dokázala, že tento zdánlivě směrovaný transport není dán existencí specifických transportních drah (tedy rozdílně směrovaných izolovaných sítkovic, které spojují jen některá místa). Elementy lýka jsou obvykle dosti složitě pospojovány (nejen podélně, ale i příčně), a na mnoha místech dochází k přestupu transportovaných látek do apoplastu a jejich resorpci zpět do lýka. To vše umožňuje směrově velmi plastický pohyb (svým způsobem cirkulaci) transportovaných látek po celé rostlině. Preferenční zásobení určitého orgánu určitou sloučeninou je obvykle dáno větší schopností „odběru“ dané látky z floémové tekutiny v daném místě.

Mechanismy řídicí výstup rozpuštěných látek z lýka jsou známy dosud nedostatečně. Principiálně jsou opět možné dvě rozdílné cesty, *apoplastová* a *symplastová*, tedy obdobně jak u naplňování lýka. Symplastová cesta výstupu je častější a je podmíněna značnou selektivitou a regulačními schopnostmi plasmodesmat. Přesnější údaje o regulaci rychlosti „odběru“ látek z lýka v určitém orgánu máme jen pro některé typy sloučenin, především pro sacharózu. Bylo zjištěno, že zcela zásadní úlohu má v tomto případě aktivita enzymu *invertázy* v těsné blízkosti lýka, která štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Tyto redukující monosacharidy již nemohou být dále transportovány lýkem, ani do něho nemohou vstupovat, neboť v membránách sítkovic a průvodních buněk nejsou pro ně transportní proteiny. Naopak, nerozložená sacharóza vstupuje zpět do lýka velmi snadno protože sacharózových přenašečů je v membránách dostatek. Orgán, který má v jisté fázi vývoje nároky na zásobení sacharózou, začne pro zvýšení jejího odběru z lýka vytvářet více invertázy. Výzkumu podnětů a procesů spojených s regulací tvorby a aktivity různých typů invertáz (existuje jich celá početná skupina!) je nyní věnována zvláště velká pozornost.

Metody pro stanovení látek vedených lýkem.

Při studiu floémového transportu nás zdaleka nezajímá pouze jeho *rychlost a směr* (ty se nejčastěji určují pomocí stabilních či radioaktivních izotopů, ale také *chemické složení a koncentrace transportovaných látek*. K tomu však potřebujeme získat vzorky floémové tekutiny. Po naříznutí sítkovic se floémový tok velmi rychle zastavuje, takže tímto způsobem nelze odběry provádět.

Naštěstí máme nyní k dispozici jinou, velmi účinnou metodu odběru, využívající svého hmyzu. Původně byla používána v entomologii k analýze potravy mšic, dnes je z ní ovšem rutinní metoda rostlinné fyziologie. Sající mšice, která svým sosákem proniká do sítkovice, nejprve zmrazíme (pevným CO₂) a pak její tělo oddělíme tak, aby sosák zůstal v rostlině. Díky stálému přetlaku ve floému (2 až 3 MPa) nám ze zbytku sosáku po dlouhou dobu vytéká tekutina k analýze (asi 1 μl za hodinu).

Další neméně vtipná metoda byla vymyšlena pro práci s bobovitými rostlinami. V mladém lusku vyřízneme okénko, abychom měli přístup k tvořícímu se semeni. U něho pak nařízneme vnější obal a vyjmeme embryo. Místo po embryu se vyplní rozehrátým agarem. Asimiláty z floému se do rostoucího embrya dostávají apoplastovou cestou přes endothel (protože floém není s embryem propojen), a tudíž velmi snadno difundují i do agaru. Agar pak ve vhodnou dobu vyjmeme a analyzujeme.

Transport plynů v rostlinách a výměny s atmosférou

Kromě transportu vody, iontů solí a organických látek jsou s životem rostliny spojeny i důležité výměny plynů. Veškerý uhlík, který je základem pro stavbu organických látek, přijímá rostlina ze vzduchu ve formě *oxidu uhličitého*. Nezbytný je i příjem *kyslíku* pro uvolňování chemické energie v respiračních procesech. Podle toho, zda převažují asimilační nebo disimilační procesy, může se směr transportu obou těchto plynů měnit. Třetí významnou plynnou složkou, jednosměrně vystupující z rostliny je *vodní pára*. Denní úhrn transportované vodní páry je obvykle více než stokrát větší než množství kyslíku a oxidu uhličitého. Některé další plyny transportované v rostlinách (např. endogenní etylen a amoniak) jsou z kvantitativního hlediska již mnohem méně významné.

Hlavní cesty a mechanismus transportu plynů

Plyny se mohou pohybovat v rostlině systémem vzájemně propojených mezibuněčných dutin naplněných vzduchem (*interceluláry*), které se obvykle vyskytují ve všech orgánech. V pletivech bez vzdušných intercelulár a uvnitř buněk je transport plynných látek možný pouze po jejich rozpuštění ve vodě. Tok plynů je udržován buď samovolným pohybem molekul po koncentračním spádu (difuze), nebo nuceným prouděním po spádu tlaku (hromadný tok).

Difuze je pro transport plynů v rostlinách mnohem významnější než pro pohyb částic v roztocích. Jednak proto, že v intercelulárách se jen zřídka vyskytují větší rozdíly tlaku, vedoucí k hromadnému toku, ale hlavně proto, že difuze v plynném skupenství je zhruba desettisíckrát rychlejší než v roztocích.

Podle *prvního Fickova zákona* platí, že rychlost difuzního toku (J_n , počet molů látky n , které projdou jednotkovou plochou za jednotku času) je úměrná koncentračnímu gradientu ($\delta C_n / \delta x$):

$$J_n = -D_n \cdot \delta C_n / \delta x$$

kde D_n je difuzní koeficient pro látku n je závislý na teplotě a některých dalších faktorech prostředí. Difuze probíhá od vyšší koncentrace k nižší, proto je výraz (podle zavedené konvence) záporný. Po úpravě uvedeného vztahu pro měřitelný rozdíl koncentrací (ΔC_n) na místech od sebe vzdálených o Δx dostáváme:

$$J_n = D_n \frac{\Delta C_n}{\Delta x} = -\frac{D_n}{\Delta x} \Delta C_n$$

Podíl $D_n/\Delta x$ nazýváme difuzní vodivost pro látku n a označujeme ji zjednodušeně jako g_n . Její převrácená hodnota ($1/g_n$) se označuje jako difuzní odpor pro látku n (r_n):

$$g_n = \frac{D_n}{\Delta x} = \frac{J_n}{\Delta C_n} = \frac{1}{r_n}$$

Používané jednotky: J [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$], C [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$], x [m], D [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$], g [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$], r [$\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$]. Hodnoty difuzní vodivosti mohou být také vyjadřovány v jednotkách [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$], přičemž platí:

$$g [\text{m}\cdot\text{s}^{-1}] = g [\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}] \cdot \frac{8,314\cdot T}{p_a}$$

kde T je absolutní teplota a p_a je tlak vzduchu během měření.

Hodnoty difuzního koeficientu jsou specifické pro jednotlivé plyny, např:

$$\begin{array}{ll} \text{CO}_2 & D = 1,51\cdot 10^{-5} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1} \\ \text{kyslík} & D = 1,95\cdot 10^{-5} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1} \\ \text{vodní pára} & D = 2,42\cdot 10^{-5} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1} \end{array}$$

Z uvedených příkladů je zřejmá závislost D na molekulové hmotnosti plynů - vyšší hodnota D u menších molekul znamená jejich rychlejší tok (za stejného rozdílu koncentrací).

Nejmenší problémy bývají s transportem **kyslíku**. Jeho obsah ve vzduchu (přibližně 21 objemových %) je natolik velký, že i při omezených difuzních cestách (zavřené průduchy v listech, nebo u orgánů s epidermis bez průduchů) netrpí rostliny jeho nedostatkem. Kyslík poměrně snadno proniká kutikulou, buněčnými stěnami i membránami, mnohem pomaleji však proniká roztoky v pletivech. Hlavním místem spotřeby jsou mitochondrie a peroxisomy. U listů s aktivní fotosyntézou obvykle kyslík vznikající při fotolýze vody pokrývá potřeby respiračních procesů, či dokonce bývá nadbytek odváděn do atmosféry.

Jisté potíže s transportem kyslíku mohou vzniknout pouze u rostlin, jejichž kořeny rostou v *anaerobním prostředí* (mokřady, zaplavené či zhutnělé půdy). U těchto rostlin mívají kořeny zvláště bohatě vyvinut systém intercelulár (až 70% plochy na příčném průřezu), zajišťující dostatečně rychlou difuzi kyslíku na vzdálenost několika desítek centimetrů. U některých vodních rostlin (např. čeledi stulíkovitých) byl objeven mechanismus vyvolávající hromadný tok vzduchu do submerzních částí (cirkulace řapíky různě starých listů v závislosti na změnách jejich teploty). Existují důkazy, že k hromadnému toku kyslíku do kořenů zaplavených rostlin (např. rýže) může docházet také v souvislosti s rozpouštěním oxidu uhličitého ve vodě. Pokud totiž není ten objem kyslíku, který se spotřebovává při dýchání, nahrazen stejným objemem CO_2 (tedy v případě úniku CO_2 do vody v okolí kořenů), pak v intercelulárech kořenů vzniká podtlak vedoucí k hromadnému toku vzduchu z nadzemních částí spojených s atmosférou.

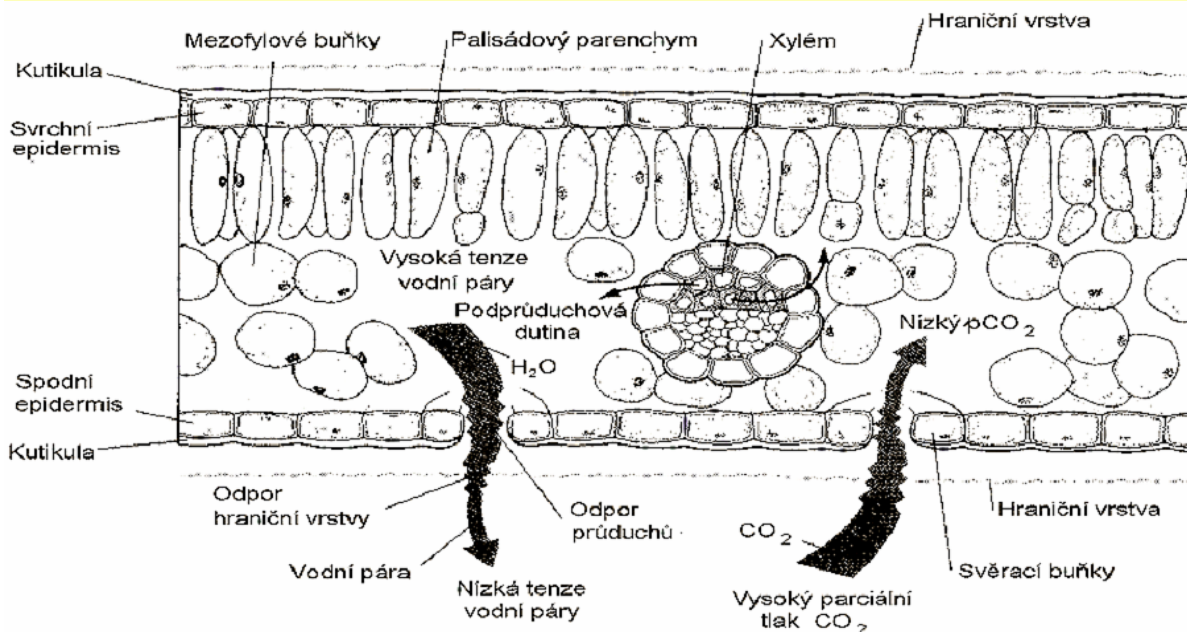
Transport oxidu uhličitého, který je produkován ve všech živých částech rostliny při aerobních respiračních procesech, je možné rozdělit na *dvě fáze*. Tou první je transport ve vodním prostředí (cytosol a hydratované buněčné stěny) a druhou pak difuze ve vzduchem naplněném prostoru intercelulár. Ve vodním prostředí je CO_2 nejen rozpuštěn, ale část molekul reaguje s vodou za vzniku kyseliny uhličité, která při pH nad 4,5 rychle disociuje na hydrogenuhličitanové ionty. I malé zvýšení pH v buňce značně snižuje poměr mezi obsahem volně rozpuštěného CO_2 a vázaného ve formě HCO_3^- iontů. Transport CO_2 ve vzduchu naplňujícím interceluláry a přestup přes epidermis s kutikulou je obvykle velmi rychlý, neboť koncentrace CO_2 vytvořená v intercelulárech respirací je poměrně vysoká (řádově několik objemových procent), zatímco ve vzduchu v okolí rostliny je velice nízká (0,036 objem. %), a tím i koncentrační spád, na kterém je závislá rychlost difuze je příznivě vysoký.

U listů s probíhající fotosyntézou zdaleka nestačí výdej oxidu uhličitého z respiračních

procesů (ty běží stále, i na světle!) krýt jeho spotřebu v asimilačních procesech. Je tedy nutný *transport CO₂ do listu*, což je spojeno s řadou vážných problémů. Vzhledem ke zmíněné nízké koncentraci CO₂ ve vzduchu je rychlost difuze obvykle nedostatečná k plnému uspokojení potřeby syntetických procesů.

Rychlost difuze CO₂ do listu je vážným limitujícím faktorem celkové rychlosti fotosyntézy a je jí proto při fyziologických výzkumech věnována velká pozornost. Čím je vlastně omezována rychlost toku CO₂ do listu? Pokud je kapacita biochemického zpracování CO₂ v buňce vysoká a koncentrace CO₂ ve vzduchu okolo listu konstantní, pak rozhodující slovo má *vodivost difuzních cest*, neboť koncentrační spád zůstává stejný. Naprostá většina CO₂ vstupuje do listů **průduchy**, které jsou nejužším místem difuzní cesty a proto také nejvíce rozhodují o rychlosti difuze. Šířku průduchových štěrbin (a tím tedy i vodivost pro difuzi CO₂) může rostlina ve značném rozmezí aktivně řídit. Funkci průduchů si v dalším textu podrobněji popíšeme, stejně tak jako metody, při kterých stanovení rychlosti toku CO₂ využíváme k odhadu rychlosti fotosyntézy a respirace.

Příjem CO₂ do listu je nutně spojen s výdejem vodní páry !



Transport vodní páry je prakticky vždy jednosměrný, z rostliny do atmosféry, neboť vzduch v intercelulárách považujeme za téměř nasycený vodní parou. Teoreticky ovšem transport vodní páry ze vzduchu do rostliny možný je - např. u silně vyschlých či podchlazených orgánů ve vlhkém prostředí. To jsou však opravdu vzácné případy. Dráha difuze molekul vodní páry z rostliny bývá velmi krátká a gradient koncentrací obvykle neobyčejně velký - z toho vyplývá i *velká rychlost difuzního toku*.

Gradient koncentrace či parciálního tlaku vodní páry mezi vzduchem a listem je nejen vyšší, ale i podstatně *proměnlivější* než tomu je u CO₂. Na tomto kolísání se podílejí jak změny parciálního tlaku vodní páry ve vzduchu, tak i v listu, a to především pro jeho silnou *závislost na teplotě*. Teplota vzduchu i listů se mění v průběhu dne často nestejným způsobem, avšak každé zvýšení teploty (jak vzduchu, tak i listů) vede obvykle k prudkému zvýšení gradientu koncentrace vodní páry.

Transport vodní páry z rostliny je možný všemi jejími částmi, ovšem daleko nejvýznamnější, tak jako v případě CO₂, je opět u listů. Orgány ve kterých neprobíhá fotosyntéza mohou mít povrch pokrytý souvislou kutikulární vrstvou s voskovými impregnacemi, která velmi zpomaluje rychlost difuze vodní páry. Asimilující orgány se však

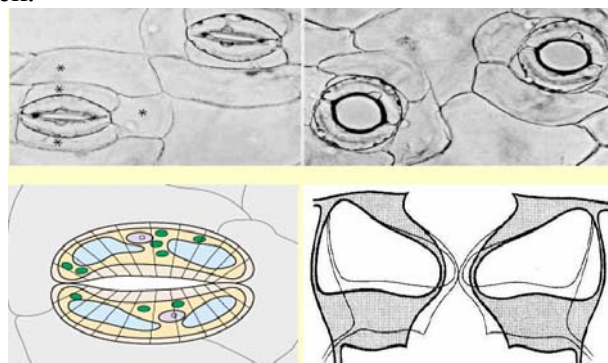
takto trvale uzavírat nemohou. Pro zajištění dostatečného přísunu CO_2 ke chloroplastům je žádoucí, aby list kladl co nejmenší odpor difuznímu toku. Rostlina je tedy postavena před *dilema, jak získat co nejvíce CO_2 a přitom ztratit co nejméně vody*. Stavba a funkce průduchového aparátu je příkladem velmi dokonalého optimalizačního řešení tohoto problému.

Průduchová regulace výměny plynů

Všechny orgány vyšších rostlin, ve kterých probíhá fotosyntetická asimilace CO_2 mají v epidermis pravidelně rozmístěny zvláštní párové buňky, označované jako *buňky svěrací*. Ty části buněčné stěny, kterými se obě svěrací buňky spolu stýkají, nejsou srostlé, ale vytvářejí *průduchovou štěrbinu*, která v otevřeném stavu zásadním způsobem usnadňuje výměnu plynů mezi vzduchem v intercelulárách a okolní atmosférou. Kdybychom sečetli plochu otevřených průduchových štěrbin, zjistili bychom, že tvoří sotva jedno procento z celkové plochy listu. Rychlost difuzního toku plynů otevřenými průduchovými štěrbinami však může být mnohem větší, než bychom očekávali - zhruba asi taková, jako kdyby polovina plochy listu nebyla vůbec pokryta epidermis. Navíc *velikost průduchové štěrbiny může rostlina aktivně a zcela spojitě měnit od stavu úplného uzavření až po plné otevření*, průduchy jí tedy dávají možnost velmi dokonale řídit rychlost výměny plynů s okolím.

Svěrací buňky průduchů při růstu listů sice vznikají ze stejného meristemického základu jako ostatní epidermální buňky, avšak při diferenciaci získávají zcela *jiné strukturní znaky*. Nejde jen o na první pohled zjevné tvarové rozdíly a zvláštní zesílené části buněčné stěny. Na rozdíl od běžných buněk pokožky mají *vždy dobře vyvinuté chloroplasty*, které však téměř *neobsahují karboxylační enzym Rubisco*. Zato v cytosolu je hojně přítomen jiný karboxylační enzym, *PEP karboxyláza*. Mají velký počet *mitochondrií* s vysokou aktivitou citrátového cyklu. Svěrací buňky *nejsou propojeny se sousedními buňkami pomocí plasmodesmat*, zato mají s nimi velmi dokonalé spojení pomocí transportních proteinů v plasmatické membráně. Všechny tyto zvláštní znaky stavby svěracích buněk podmiňují jejich správnou funkci.

Mechanika pohybů průduchů je známa velmi dobře. Otvírání průduchové štěrbiny je způsobeno *transportem vody z buněk listového mezofylu do svěracích buněk*, tedy zvětšením jejich objemu. Tím, že ve stěnách svěracích buněk převažuje příčná (radiální) orientace celulósových vláček (micel), nemají tyto buňky po příjmu vody tendenci zakulacovat svůj tvar (a tím tedy uzavírat štěrbinu), ale spíše protahovat se do délky. Vzhledem k pevnému ukotvení konců svěracích buněk do buněčných stěn sousedních buněk je výsledkem protahování jisté prohnutí ("vyboulení") svěracích buněk bočním směrem. Tím se štěrbinu rozevívá. Toto základní schéma může být poněkud modifikováno u rostlin s atypickou morfologií svěracích buněk, např. u trav dochází ke zvětšení objemu pouze v rozšířených koncích svěracích buněk.



Průduch v uzavřeném a plně otevřeném stavu (nahore). Vlevo dole je znázorněno příčné uložení celulosových (micel) v buněčných stěnách svěracích buněk, vpravo příčný řez svěracími buňkami v otevřeném a uzavřeném stavu.

Vysvětlením mechaniky pohybů jsme však teprve na úplném začátku řetězce příčin a následků. Čím je způsoben náhlý příjem vody do svěracích buněk při otvírací reakci? Bylo dokázáno, že jde o příjem vyvolaný zvýšením osmotického tlaku ve svěracích buňkách, a to v důsledku *rychlého přesunu iontů draslíku*. Náhlý tok draslíkových iontů do svěracích buněk je ovšem závislý na otevření iontových kanálů pro draslík v plazmatické membráně, a současně na *stimulaci protonových pump*, jejichž aktivitou dochází k přesunu vodíkových iontů na vnější stranu plazmatické membrány. Chybějící vodíkové ionty v cytosolu svěracích buněk jsou doplňovány *disociací organických kyselin*, především kyseliny jablečné a citrónové, jejichž tvorba z rezervních sacharidů je rovněž stimulována (= biochemický pHstat umožňující zachovat optimální pH pro enzymatické procesy v cytosolu). Vytvořený vysoký elektrochemický potenciál nahromaděním protonů v buněčné stěně je podmínkou rychlého difusního toku iontů K^+ do cytosolu svěracích buněk. Přesun iontů draslíku bývá někdy provázen i přesunem jistého množství chloridových iontů.

Při *zavírací reakci* průduchů je aktivita protonových pump inhibována, ale současně dochází k aktivaci membránových proteinů pro export malátových aniontů ze svěracích buněk. Tím dojde k depolarizaci plazmatické membrány a k samovolnému transportu iontů draslíku z cytosolu svěracích buněk do buněčné stěny a do buněk vedlejších. Stejným směrem začne osmoticky difundovat i voda, turgorový tlak se sníží a průduch se zavře. Existence malátového přenašeče v membránách svěracích buněk a jeho klíčová významnost pro zavírací reakci průduchů byla objevena teprve v roce 2008.

Jaký *signál* však spouští celý otvírací a zavírací mechanismus do pohybu? Výsledkem mnohaletého usilovného hledání způsobu řízení pohybů průduchů je zjištění, že *neexistuje jediný signál či řídicí okruh, ale u každé rostliny je jich vždy několik* a na zcela odlišných principech, ale působících často současně v koordinované souhře.

Světlo (viditelné záření) je zcela evidentně jedním z významných signálů. Za tmy jsou průduchy u většiny rostlin uzavřeny (výjimku tvoří jen některé sukulentní rostliny metabolickou cestou CAM, ke kterým se ještě vrátíme v kapitole o fotosyntéze). Po osvětlení však dochází k rychlému otevření. Vysvětlit přenos tohoto signálu však není jednoduché. Podle dřívějších představ měl být vliv světla zprostředkován jeho absorpcí v chlorofylu a posléze sníženou koncentrací CO_2 v intercelulárách v důsledku aktivované fotosyntézy. Dnes však víme, že kromě tohoto nepřímého mechanismu může světlo působit na pohyby průduchů také přímo, nezávisle na fotosyntéze. *Největší účinek má světlo modré (o vlnové délce 430 až 460 nm), které aktivuje činnost protonových pump v plazmatické membráně svěracích buněk*. Tato aktivace je zprostředkována flavoproteinovým pigmentem označovaným jako *kryptochrom*, který je vázán v plazmatické membráně svěracích buněk.

Koncentrace CO_2 ve vzduchu v intercelulárách má neobyčejně významný vliv na pohyby průduchů (za nízké koncentrace se otvírají, vysoká naopak vede k zavírání). Koncentrace CO_2 bývá velmi často hlavním řídicím signálem, a to především za nízkých a kolísavých hodnot záření, kdy *otvírání průduchů se může v podstatě zpětnově řídit rychlostí spotřeby CO_2 ve fotosyntéze*. Do jaké míry se na tomto řízení podílí i fotosyntéza přímo ve svěracích buňkách, není ještě bezpečně prokázáno - existuje řada prací svědčících pro, ale i proti. Nicméně změny koncentrace CO_2 v intercelulárách vyvolávají pohyby průduchů i za tmy, což je důkazem, že musí existovat řídicí mechanismus nezávislý na fotosyntéze.

Nedostatek vody v listu (vodní deficit), provázený poklesem vodního potenciálu a turgoru, způsobuje za i jinak příznivých okolností (dostatek světla, potřeba dodávat CO_2 pro fotosyntézu) zavírání průduchů, neboť *ochrana listu před nadměrnou ztrátou vody má prioritu před maximalizací toku CO_2 pro fotosyntézu*. Jak již víme, průduchy se udržují v otevřeném stavu díky vysokému turgoru svěracích buněk a tak není obtížné si představit jejich pasivní zavření v důsledku většího snížení obsahu vody, a tím i ztráty turgoru, ve všech buňkách listu.

Existuje však ještě jiný, citlivější způsob reakce na nedostatek vody, který umožňuje rostlinám zavírat průduchy mnohem dříve, než dojde k větší ztrátě vody. Jde o reakci zprostředkovanou *kyselinou abscisovou*, která je jedním z důležitých fytohormonů. Kyselina abscisová se uvolňuje z mezofylových buněk již při velmi mírném poklesu jejich turgoru a je vedena ke svěřacím buňkám. Působením kyseliny abscisové dochází k inhibici činnosti protonových pump, ovšem zprostředkovaně, pomocí vnitrobuněčných druhotných mediátorů, ke kterým patří v první řadě ionty vápníku. Koncentrace iontů vápníku ovlivňuje v buňce rychlost enzymově řízených reakcí (např. fosforylace), na nichž je závislá činnost protonových pump v membránách, a tudíž i rychlost transportu K^+ do svěřacích buněk.

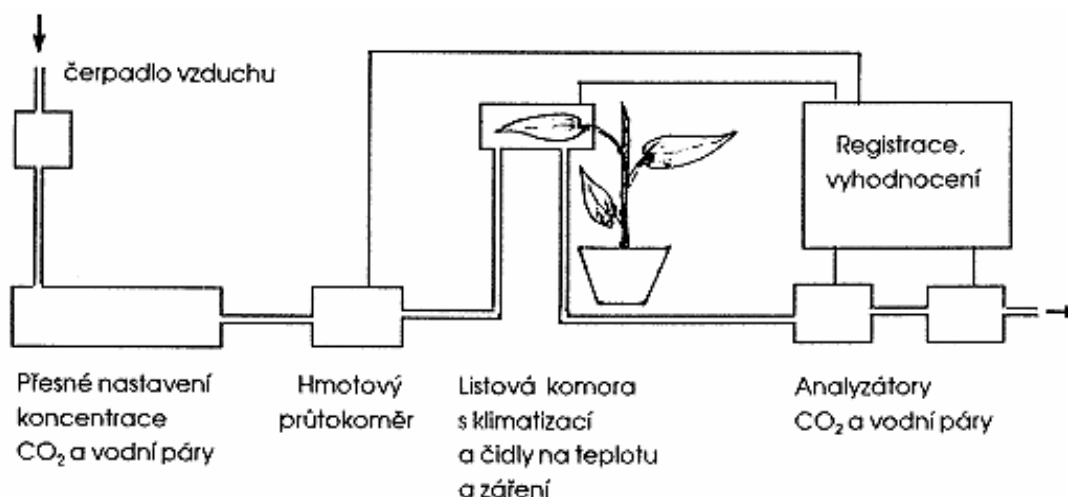
Je zajímavé, že ke zvýšení koncentrace kyseliny abscisové v listech (a tím i k zavírání průduchů) může dojít i jejím *transportem z jiných orgánů*, zejména z kořenů. Začínající nedostatek vody v půdě (ale i některé jiné stresové podněty, např. zasolení či nedostatek kyslíku) indukují v kořenech syntézu kyseliny abscisové, která je xylémovým tokem rychle transportována do listů. Signál přitom může pocházet jen z jedné části kořenového systému, která začíná být vystavena stresovým faktorům. K zavírání průduchů tímto mechanismem může tedy dojít i za stavu, kdy listy mají ještě vody dostatek (např. jsou zásobeny z té části kořenů, která dosud může přijímat vodu), tedy v předstihu před hrozícím celkovým nedostatkem.

Vysoká citlivost průduchů na *vlhkost vzduchu* u některých druhů byla objevena poměrně nedávno. Velmi nízký parciální tlak vodní páry ve vzduchu okolo listu vede k zavírání průduchů zcela nezávisle na stavu vody v listu (i při plném nasycení listových pletiv!). Jde tedy o další velmi citlivý regulační mechanismus k včasnému zabránění ztrát vody, kromě popsané regulace pomocí kyseliny abscisové. Pokles vlhkosti vzduchu při otevřených průduších znamená vždy velké zvýšení výparu vody z listů a díky rychlé reakci průduchů lze těmto ztrátám zabránit hned v samém počátku. To je zvláště důležité pro rostliny, které mohou jen velmi obtížně a zřídka doplňovat ztracenou vodu (např. epifyty). U rostlin které mají zajištěno trvalé zásobení vodou z vlhké půdy není přímá reakce průduchů na koncentraci vodní páry ve vzduchu ani příliš významná, ani prospěšná. Unáhleným zavřením průduchů by se totiž zbytečně zkracovala doba příznivá pro rychlý příjem CO_2 .

Závěrem tedy můžeme shrnout, že *kromě přímého vlivu světla na otvírání průduchů existují ještě nejméně dva další účinné regulační systémy se zpětnou vazbou. První je řízen koncentrací CO_2 v intercelulárách a zajišťuje tok CO_2 přiměřený potřebám fotosyntézy, druhý systém řízený stavem vody v pletivech (s přenosem signálů pomocí kyseliny abscisové) přizpůsobuje tok vodní páry z listu možnostem příjmu vody rostlinou a chrání ji před nadměrnou ztrátou.*

Měření rychlosti výměny plynů a vodivosti průduchů

Měření rychlosti výměny plynů (O_2 , CO_2 , vodní pára) je nejčastěji založeno na stanovení změn jejich koncentrace ve vzduchu v těsné blízkosti rostliny. Technicky nejschůdnější řešení spočívá v uzavření rostliny (častěji však jen její části, např. listu) do průhledné komůrky. Změny koncentrace plynů měříme buď v protékajícím vzduchu (otevřený systém, určíme rozdíl v koncentraci před vstupem do komůrky a po výstupu), nebo v cirkulující smyčce (uzavřený systém, vyhodnocujeme rychlost poklesu či vzestupu koncentrace). Komůrka musí být konstruována tak, aby bylo možno řídit podmínky prostředí uzavřeného orgánu (teplotu, ozáření, ventilaci). Pro *analýzu plynů* je k dispozici řada přesných analyzátorů a čidel (*kyslík*: paramagnetické analyzátory, čidla Clarkova typu. *CO_2* : analyzátory infračerveného záření. *Vodní pára*: psychrometry, kapacitní čidla, měřiče rosného bodu, aj.). Rychlost výdeje vodní páry z rostlin můžeme také určovat z úbytku jejich hmotnosti krátce po odříznutí.



Zjednodušené schéma aparatury pro měření rychlosti výměny plynů u rostlin.

Pro **měření difuzní vodivosti průduchů** se používají přístroje označované jako difusní *porometry*. Základním principem je přesné stanovení rychlosti výdeje vodní páry z uzavřené části rostliny (z kontinuálního měření vlhkosti vzduchu v komůrce) a dále z měření teploty vzduchu a objektu (obvykle listu) v komůrce. Pak lze vypočítat za pomoci fyzikálních vztahů či tabulek i rozdíl mezi koncentrací vodní páry uvnitř listu (e_s , je považována za nasycenou při dané teplotě listu) a v okolním vzduchu (e_a). Tok vodní páry z listu (J_{VP}) lze vypočítat z měřené rychlosti vzestupu vlhkosti vzduchu v komůrce. Jak již bylo uvedeno na začátku této kapitoly, obecně pro rychlost difuzního toku platí, že je přímo závislý na rozdílu koncentrací a na difuzní vodivosti. Rychlost toku vodní páry z listu je tedy:

$$J_{VP} = (e_s - e_a) g_{VP}$$

Difuzní vodivost epidermis pro vodní páru (g_{VP}) lze tudíž vypočítat:

$$g_{VP} = \frac{J_{VP}}{e_s - e_a}$$

Při této metodě není stanovena pouze vodivost průduchů, ale celé epidermis, tedy i kutikuly. Ta je ovšem ve srovnání s vodivostí otevřených průduchů zanedbatelně malá (více než stokrát menší).

Difuzní vodivost epidermis listů pro CO_2 (g_{CO_2}) můžeme odvodit z vodivosti pro vodní páru (g_{VP}), stanovené popsáním způsobem. Není s ní ovšem nikdy totožná. Molekuly CO_2 mají totiž větší hmotnost než molekuly vodní páry, a proto i menší hodnotu difuzního koeficientu (difuze je pomalejší). Je proto nutné hodnoty g_{VP} snížit úměrně ke vzájemnému poměru difuzních koeficientů:

$$g_{CO_2} = g_{VP} \frac{D_{CO_2}}{D_{VP}} = 0,62 g_{VP}$$

Ještě jeden rozdíl v rychlosti difuze musíme vzít v úvahu. Při difuzi CO_2 do listu současně difunduje vodní pára z listu, přičemž počet vystupujících molekul vodní páry je až tisíckrát větší než počet vstupujících molekul CO_2 . Tím je rychlost difuze molekul CO_2 poněkud zpomalena (až o 15%). Pro přesné výpočty je tedy nutné provést vhodnou korekci.

Kontrolní otázky k 1. části učebního textu Fyziologie rostlin

1. Jak je definován vodní potenciál a jaké dílčí složky určují jeho celkovou hodnotu?
2. Rostlinné buňky se sice chovají jako osmotický systém, ale ne zcela dokonalý. V jakých funkčních znacích se odchyľují od ideálního osmotického systému?
3. Pokud bychom buňku s osmotickým tlakem cytosolu $\pi = 1,2$ MPa ponořili do roztoku s hodnotou osmotického tlaku $\pi = 0,4$ MPa, jaký hydrostatický (turgorový) tlak by se v ní vytvořil? (za předpokladu, že by se chovala jako ideální osmotický systém).
4. Jakým způsobem mohou rostlinné buňky velmi rychle měnit osmotický tlak cytosolu?
5. Z jakých důvodů je pro rostliny důležité udržovat vysoký turgorový tlak v buňkách a na jakých buněčných parametrech závisí jeho nejvyšší dosažitelná hodnota v průběhu dne?
6. Zdůvodni, zda je, nebo naopak nikdy není možný tok vody z kořenů do půdy!
7. Může pronikat půdní roztok u některých druhů rostlin buněčnými stěnami (apoplastem) z půdy až do xylému?
8. Na jakých okolnostech závisí rychlost toku vody do buňky přes její plazmatickou membránu? (vztaheno je jednotku plochy membrány).
9. Jak se obvykle mění hodnoty hydrostatického tlaku ve vodivých elementech xylému (zvyšují - snižují) v nočních hodinách? (ve srovnání s denními hodinami).
10. Za jakých okolností může dojít k samovolnému vytékání vody z pahýlu po odříznutí stonku (kořenový vztlak) a co je jeho příčinou?
11. Jaké jsou příčiny vzniku bublinek ve vodivých elementech xylému (kavitace, plynová embolie) a jaké mechanismy umožňují rostlinám zajistit i v tomto případě tok vody?
12. Jaké maximální rychlosti může dosahovat transport vody u našich listnatých stromů s širokými cévami ve srovnání s jehličnatými stromy?
13. Proč se nutně musí lišit mechanismus příjmu iontů živin z půdního roztoku do buněk kořenů od příjmu vody? Jaké problémy pro rostlinu by nastaly, pokud by probíhal shodně?
14. Jaké jsou rozdíly v mechanismu transportu a v přenosové kapacitě mezi selektivními kanály a přenašeči?
15. Jaké typy protonových pump se vyskytují v membránách rostlinných buněk a jaká je jejich efektivita (měřeno spotřebou energetických zdrojů na transport 1 molu protonů)?
16. Jak probíhá sekundárně aktivní (spřažený) transport a k jakým transportům (co odkud kam) je u rostlinných buněk nejčastěji využíván?
17. Jakými podněty (signály) je nejčastěji aktivováno otvírání selektivních kanálů v membránách rostlinných buněk?
18. Zdůvodni, zda může nebo nikdy nemůže dojít k transportu iontů živin (např. K^+) z půdy do kořenů prostou difuzí (přes selektivní kanály), je-li jejich koncentrace v kořenových buňkách desetkrát vyšší než v půdním roztoku okolo kořene!
19. Jaké sloučeniny bývají v největším množství transportovány v lýku?
20. Co je hybnou silou transportu roztoků v lýku a proč může i ve stejné sítkovici dojít v průběhu dne k obrácení směru proudění?

21. Popiš hlavní principy apoplastové a symplastové cesty naplňování lýka!
22. Jakým způsobem je řízen odběr sacharózy z foémové tekutiny v místech největší potřeby?
23. Jaké jsou hlavní rozdíly v transportních výměnách rostlin s jejich okolím mezi těmito plyny: vodní pára, oxid uhličitý a kyslík.
24. Jaké anatomické a biochemické zvláštnosti mají svěrací buňky průduchů ve srovnání s ostatními epidermálními buňkami a jaký je funkční význam těchto zvláštností?
25. Jakým způsobem jsou pohyby průduchů vázány na mezibuněčný transport draslíkových iontů a čím je směr tohoto transportu podmíněn?
26. Jakým mechanismem je zajištěno otvírání a zavírání průduchů v závislosti na aktivitě fotosyntetických procesů v mezofylových buňkách?
27. Jakým mechanismem je spouštěna zavírací reakce průduchů na začínající nedostatek vody v půdě, i když listy jsou ještě vodou zcela nasyceny?
28. Jakým způsobem bychom mohli vypočítat difuzní vodivost epidermis listů pro vodní páru a oxid uhličitý?