

# Fyziologie rostlin

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

## 2. ČÁST - METABOLICKÉ PROCESY

Poznávání neuvěřitelně velkého množství chemických sloučenin a reakcí při přeměnách látek v živých buňkách je hlavní náplní vědního oboru biochemie. Pro rostlinného fyziologa jsou detailní znalosti o metabolických pochodech ovšem také velice cenné, především jako podklad k vysvětlení procesů na vyšších organizačních úrovních (orgány, celé rostliny). Fyziologie rostlin však nejen využívá biochemické poznatky, ale má vypracované i vlastní metodické přístupy jak studovat metabolické projevy rostlin *nedestruktivně (in vivo)*, a to i u rostlin rostoucích v přírodních podmínkách. K pochopení vztahů mezi metabolismem a ostatními funkcemi rostliny bude směřovat následující část učebního textu. Nemůžeme ale zcela vypustit přehled základních poznatků o metabolických procesech na buněčné úrovni.

### Fotosyntetická asimilace oxidu uhličitého - základní poznatky

Naprostá většina rostlin získává veškerou energii pro své metabolické procesy z primárního energetického zdroje - slunečního záření, a veškerý uhlík z anorganické sloučeniny - oxidu uhličitého. Jsou to tedy *fotoautotrofní* organismy. Díky těmto schopnostem mají klíčové postavení v celé biosféře, neboť ostatní (heterotrofní) biotické složky ekosystémů, včetně člověka, pouze využívají energii bohaté organické látky vytvořené rostlinami.

Procesy vedoucí k vazbě oxidu uhličitého do organických sloučenin s využitím radiační energie označujeme jako fotosyntetickou asimilaci  $\text{CO}_2$ , zkráceně (i když ne zcela přesně) hovoříme o fotosyntéze. Obecněji lze definovat fotosyntézu jako ***souhrn procesů spojených s přeměnou energie fotonů (kvant záření) do volné chemické energie, která je dále využita při biologických syntézách.*** Chemická energie získaná ze záření může být totiž využita přímo v chloroplastu nejen k redukci anorganických sloučenin uhlíku, ale i k jiným biochemickým reakcím, např. k redukci anorganických sloučenin dusíku a síry.

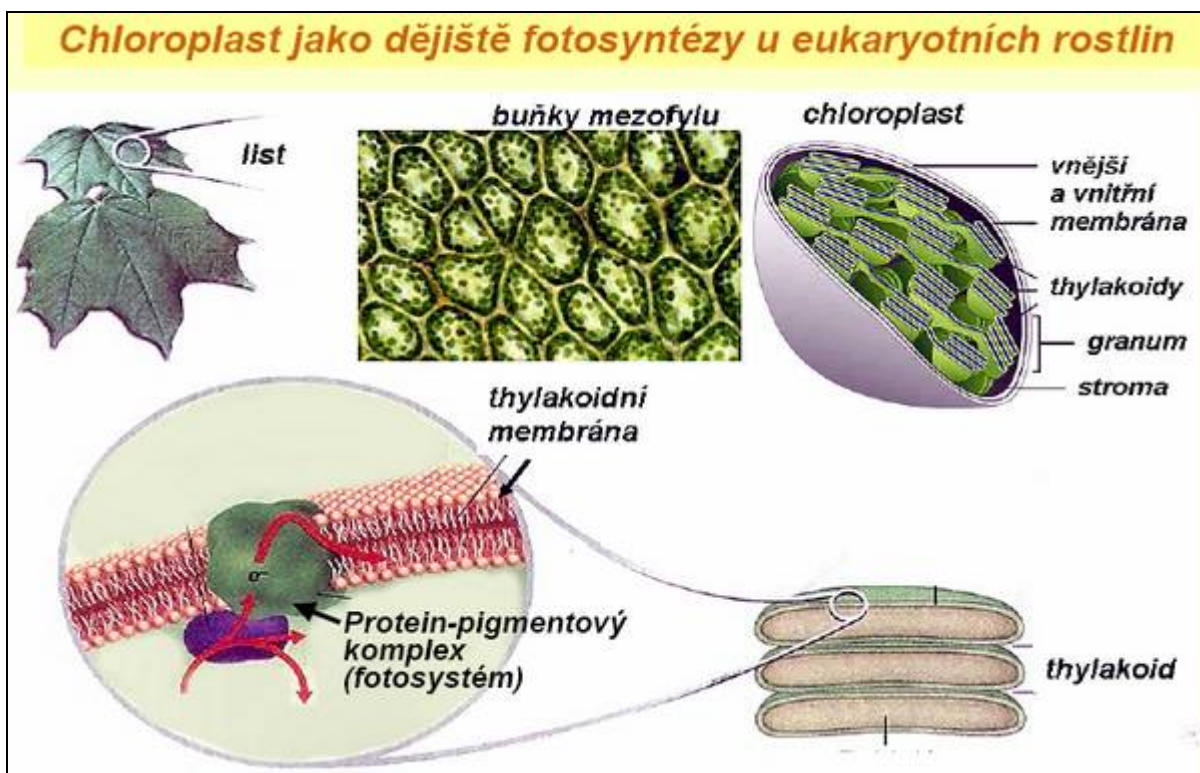
Fotosyntetická *asimilace oxidu uhličitého*, která je ústředním metabolickým procesem rostlin, zahrnuje velké množství dílčích reakcí, které lze rozdělit do tří skupin:

- **fyzikální procesy** související s absorpcí zářivé energie v molekulách asimilačních pigmentů a s rezonančním přenosem zachycené energie k reakčním centrům,
- **primární fotochemické a redoxní procesy** spojené s přenosem elektronů redoxními systémy k redukci NADP (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a k energetické podpoře vzniku ATP (adenosintrifosfátu) z ADP (adenosindifosfátu),
- **sekundární biochemické reakce**, ve kterých dochází k vazbě  $\text{CO}_2$  do organických sloučenin s využitím energie produktů primárních procesů.

Je potřeba poznamenat, že fotosyntetické procesy jsou z evolučního hlediska velmi staré - vyvinuly se již u primitivních prokaryotních organismů před několika miliardami let, i když zpočátku jejich účinnost byla malá. V této původní podobě zůstaly zachovány např. u sírných bakterií. Ale již u sinic (což jsou ovšem také velmi staré prokaryotní organismy) evoluce fotosyntézy značně pokročila - složitější struktura protein-pigmentových součástí fotosyntetického aparátu vedla ke zvýšení celkové efektivity. Navíc nově nabytá schopnost uvolňovat elektrony štěpením molekul vody a využívat je k tvorbě redukovaných sloučenin otevřela těmto organismům cestu ke kolonizaci širokého spektra stanovišť. Do nejdokonalejší podoby se ovšem fotosyntetické procesy rozvinuly až u eukaryotních rostlin, kde probíhají ve specializovaných organelách - chloroplastech.

## Stavba hlavních funkčních celků v thylakoidech chloroplastů

**Chloroplasty** jsou orgány s dvojitou povrchovou membránou a s dalším, vysoce specifickým vnitřním membránovým systémem, označovaným jako **thylakoidy**. Thylakoidní membrány sice vznikají z vnitřní obvodové membrány chloroplastu, avšak vytvářejí zcela oddělenou soustavu uzavřených plochých váčků. Skupiny těsně na sebe přiléhajících thylakoidů nazýváme **grana**. Ty části membrán, které k sobě v granech přiléhají, označujeme jako granální (přitisknuté, stěsnané) thylakoidní membrány. Mají poněkud odlišnou skladbu a funkci než ty, které volně komunikují s okolím. Prostor uvnitř thylakoidů (**lumen**) je vyplněn vodou s rozpuštěnými solemi. Thylakoidy jsou vysoce specializované struktury sloužící k efektivnímu zajištění krajně obtížných *fotochemických* procesů, tedy vlastní přeměny radiční formy energie v chemickou. Gelový roztok mezi thylakoidy (**stroma**) je dějištěm mnoha desítek *biochemických* procesů – probíhá zde např. tvorba bílkovin kódovaných v plastidovém genomu, syntéza asimilačních barviv, mastných kyselin, ale zcela převažují procesy vedoucí k asimilaci anorganických forem uhlíku, dusíku a síry.



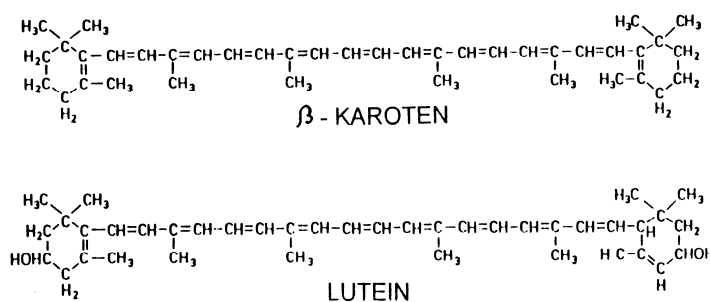
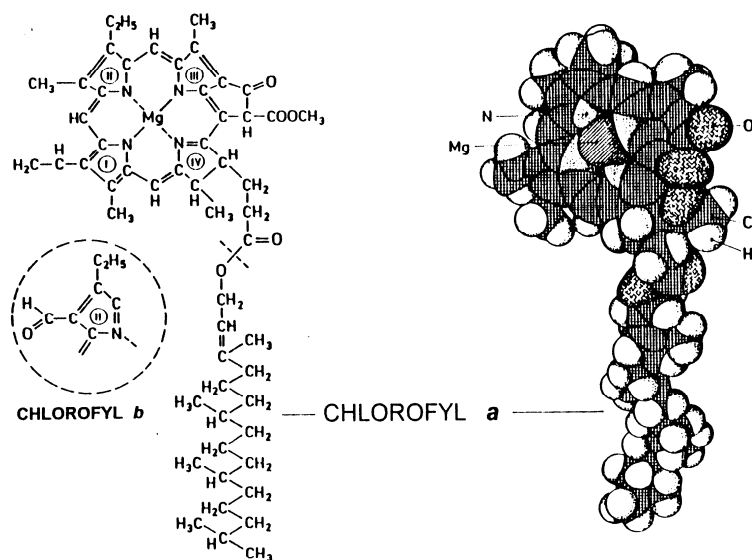
### Specifické znaky chloroplastů

- semiautonomní orgány s vlastním genomem, proteosyntézou a množením (dělením),
- obsahují asi 300 druhů proteinů, syntetizují však z nich jen asi 90 (ostatní se importují z cytosolu),
- vytvářejí se z proplastidů, do funkčního stavu se vyvíjejí jen na světle,
- mají dvojitou membránu na obvodu a uvnitř další membránový systém plochých váčků (thylakoidů),
- thylakoidy mají zvláštní typ membrán s vysokým obsahem galaktolipidů (místo fosfolipidů).

V membránách thylakoidů je pozoruhodně vysoký obsah integrálních bílkovin - obvykle asi 60 až 65 % jejich hmotnosti. Na většinu z nich se váže velké množství molekul asimilačních barviv (chlorofylů a karotenoidů) za vzniku **protein-pigmentových komplexů**.

Proteiny v thylakoidních membránách, ať už s navázanými pigmenty či bez nich, nejsou rozmístěny náhodně, ale sdružují se do velmi *dokonale organizovaných shluků* (funkčních celků), které mohou sice pracovat do značné míry samostatně, ale obvykle spolu navzájem spolupracují. Rozdělujeme je do čtyř hlavních skupin: **fotosystém I, fotosystém II, cytochromový komplex a ATP-syntáza**.

Oba typy fotosystémů (I a II) se skládají z centrální části (**reakční centrum, jádro fotosystému**), která je obklopena světlosběrným protein-pigmentovým komplexem, označovaným zkratkou **LHC** (= *Light Harvesting Complex*), nebo též jako **anténa**. Funkcí antény je pouze *zachycovat a induktivní rezonancí předávat excitační energii (ne elektrony!) do reakčního centra, kde začíná vlastní přenos elektronů*. Na transmembránových proteinech jádra bývají připojeny nejen asimilační barviva, ale i molekuly látek s redoxními vlastnostmi, které slouží jako přenašeče elektronů.



Chemická stavba nejčastějších asimilačních pigmentů

Z asimilačních barviv, kterých bývá v každém z obou fotosystémů několik stovek molekul, má zcela výjimečné postavení **chlorofyl a**. Nejen proto, že je ho daleko největší množství (asi tři čtvrtiny všech barviv v chloroplastech), ale také pro schopnost přejít do ionizovaného stavu ztrátou elektronu při jeho excitaci zářivou energií. Tuto schopnost mají ovšem jen některé molekuly chlorofylu **a** umístěné v jádru fotosystémů. Chlorofyl **a** nacházíme ve všech částech fotosystémů, na rozdíl od chlorofylu **b**, který bývá zastoupen pouze v anténách.

**Chlorofyl *b*** má jen přídavnou (akcesorickou) funkci, pro fungování fotosyntetického aparátu není nezbytný. Chlorofyly jsou zelené, protože zelenou část viditelného spektra nejméně absorbují, a tudíž většinu jí odrážejí. Největší absorpci mají v oblasti modré (vlnové délky zhruba 400-500 nm) a červené (600-700 nm).

**Karotenoidy** mají nejčastěji žlutou, oranžovou a červenou barvu. Absorbují hlavně krátkovlnnou část viditelného záření (mezi 400 - 500 nm). Nacházíme je jak v anténách, tak i v jádře fotosystémů. K nejhojnějším patří **beta-karoten** a ze skupiny xantofylů pak **lutein**. Mají jednak funkci světlosběrnou (jako doplňkové pigmenty), ale navíc velmi významnou funkci ochrannou. Pokud totiž molekuly chlorofylu absorbují více zářivé energie, než může být využito pro přenos elektronů, pak může dojít k energetickému ovlivnění molekul kyslíku. Vzniklý "singletový" kyslík, i některé další „reaktivní“ formy aktivovaného kyslíku, mají destrukční účinky na stavební součásti thylakoidů. Pokud je ale nadbytečná energie převedena ke karotenoidům, může být zneškodněna přeměnou na teplo. Podrobněji jsou tyto procesy popsány ve čtvrté části těchto učebních textů, která je věnovaná stresové fyziologii. Karotenoidy jsou právě pro svoji ochrannou funkci pro život rostlin naprosto nezbytné. Bezkarotenoidní mutanti působením světla velmi rychle hynou.

Dva zmíněné typy fotosystémů mají kromě uvedených společných znaků i řadu odlišností ve své stavbě a funkci. Existují i jisté rozdíly mezi druhy a navíc *tentýž druh může složení fotosystémů (hlavně početnost LHC) poněkud měnit v závislosti na podmínkách prostředí*. Níže uvedené charakteristiky mají proto značně pravděpodobnostní charakter.

**Fotosystém I (PS I)** se nachází výlučně ve „volných“ částech thylakoidních membrán, které komunikují přímo se stromatem. Nevyskytuje se tedy v těch částech thylakoidů, které k sobě těsně přiléhají. Jádro fotosystému I (reakční centrum) obsahuje především dva velké polypeptidy (Ia, Ib), které na sebe vážou ionizovatelnou molekulu chlorofylu *a* (označovanou jako **P700**, neboť absorbuje nejvíce záření o vlnové délce 700 nm). Obvykle se však jedná o *dimer*, tedy o dvě stejné, spojené molekuly. Celkem je k proteinům reakčního centra připojeno ještě asi 50 až 130 dalších molekul chlorofylu *a*, společně s několika molekulami karotenoidů. K proteinům reakčního centra je též připojeno několik redoxních sloučenin sloužících k přenosu elektronů (blíže viz str.8). Anténní systém fotosystému I (= *světlosběrný komplex, LHC I*) obsahuje asi 100 molekul chlorofylu *a* i *b* (v přibližném poměru 3:1), které jsou vázány na několik integrálních proteinů v těsné blízkosti reakčního centra.

**Fotosystém II (PSII)** je lokalizován v granálních (přitisknutých, stěsnaných) membránách thylakoidů. Jeho hlavní část (bez vnější antény) je tvořena obvykle šesti integrálními a třemi periferními proteiny. Jádro (reakční centrum) fotosystému II tvoří dva integrální proteiny označované jako D1 a D2, na které bývá navázáno asi 50 molekul chlorofylu *a*, včetně jedné zvláštní ionizovatelné molekuly **P680** (označení opět vyjadřuje vlnovou délku světla s maximem absorpce). Dále je na proteiny jádra fotosystému trvale připojeno několik molekul přenašečů elektronů (feofytin, a dva plastochinony typu Q<sub>A</sub> a Q<sub>B</sub>). K fotosystému II patří i komplex ve kterém dochází k **fotolýze vody**. Bývá též označován jako **OEC (Oxygen Evolving Center)**. Je tvořen několika malými periferními proteiny, připojenými z vnitřní strany (z lumen) thylakoidní membrány. Na nich jsou navázány 4 ionty manganu, dále ionty Cl<sup>-</sup> a Ca<sup>2+</sup> k přenosu elektronů mezi komplexem oxidace vody a P680 slouží redoxní změny v molekule aminokyseliny thyrosinu.

Na proteiny v těsné blízkosti reakčního centra fotosystému II bývá obvykle připojeno asi 100 molekul chlorofylů *a* + *b*, a také několik molekul beta-karotenu. Dohromady tak vytvářejí celek označovaný jako **vnitřní anténa**. Kromě toho je k fotosystému II volně připojena ještě další, **vnější anténa** (= vnější LHC II). Ta obsahuje celkem asi 100 až 200 molekul chlorofylů *a* + *b*, a také jisté množství karotenoidů (hlavně xantofylů, např. violaxanthin a lutein). Pigmenty ve vnější anténě jsou také vázány na vhodné nosiče - bílkovinné molekuly (vždy asi 10 molekul chlorofylu, a 1 až 3 molekuly karotenoidů na



jeden polypeptid). Vnější antény nejsou pevně spojeny s vnitřními částmi fotosystému. Za nadměrně vysokých hodnot záření se mohou od fotosystému II odpojit, a tím zabránit jeho poškození nadbytečnou excitační energií.

**Cytochromový komplex** (cyt  $b_6$  - cyt  $f$ ) je složen ze čtyř proteinů. Tento komplex bývá zastoupen ve všech částech membrán thylakoidů. Jeho hlavní funkcí je zprostředkování transportu elektronů z fotosystému II na fotosystém I (ve spolupráci s mobilními přenašeči - plastochinon a plastocyanin, viz dále).

**ATP-syntáza** (dříve nazývaná "Coupling Factor", CF) je rozmístěna vždy v blízkosti fotosystému I, to znamená jen v těch částech thylakoidních membrán, které volně komunikují se stromatem. Tvoří ji komplex devíti polypeptidů - velmi podobný tomu, jaký nalézáme i v mitochondriích. Funkci má jednoznačnou - zprostředkovat tvorbu ATP z ADP při transportu protonů nahromaděných uvnitř thylakoidních váčků (= v *lumen*) do stromatu.

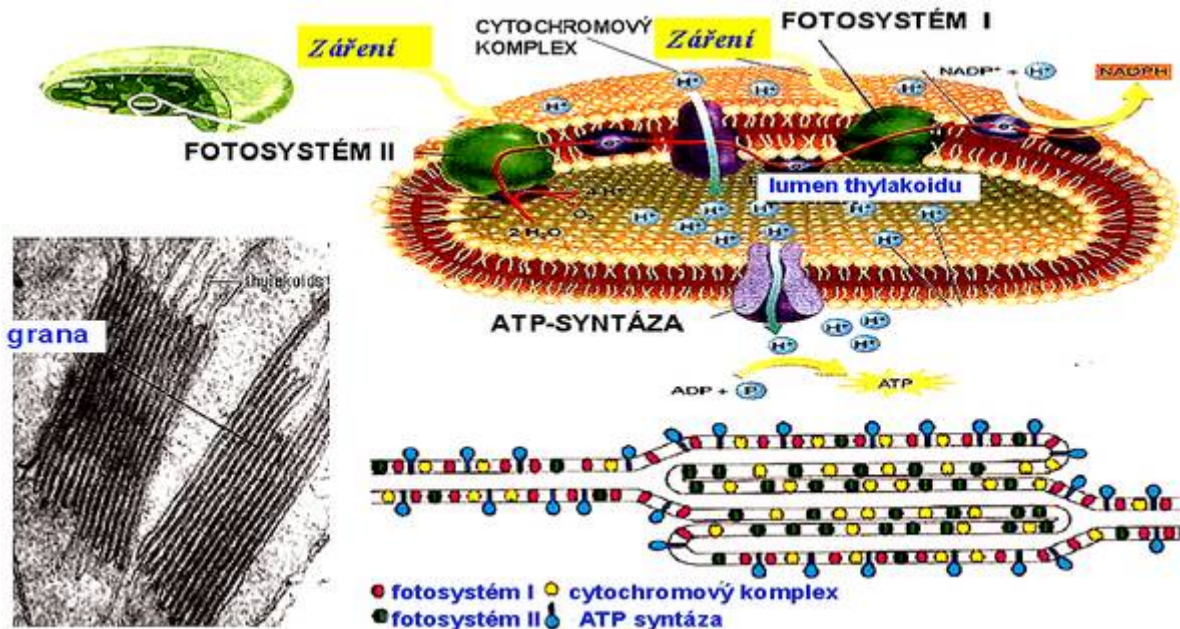
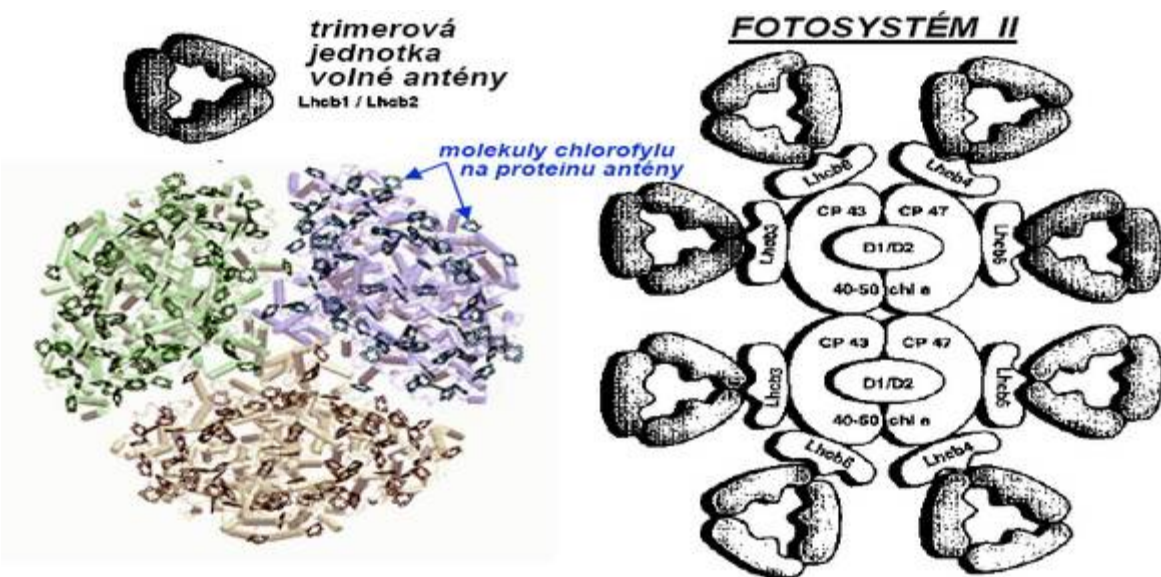


Schéma uložení hlavních proteinových komplexů v thylakoidní membráně. Je také naznačena jejich součinnost při přenosu elektronů a protonů, blíže popisovaná v dalším textu.

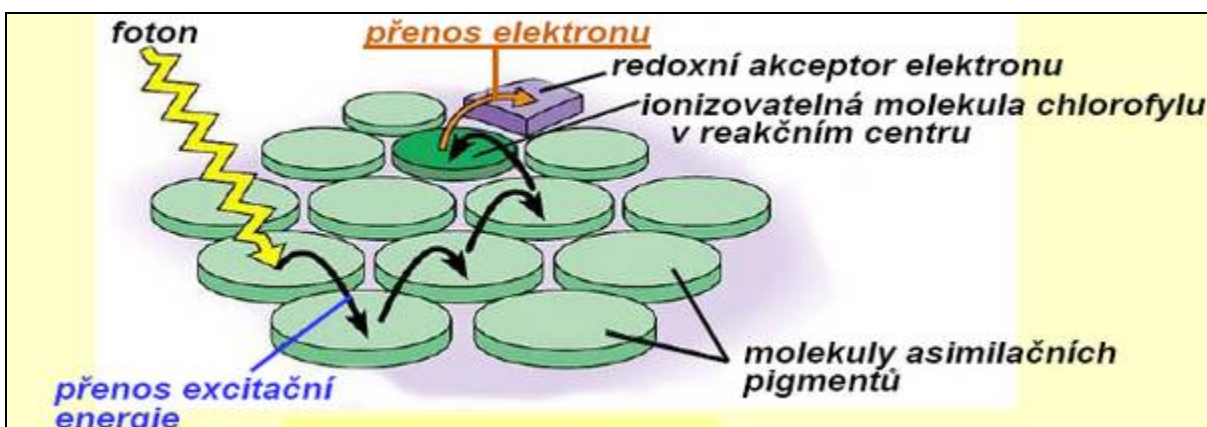


Organizace světlosběrných systémů (antén) u fotosystému II.

## Průběh primárních procesů fotosyntézy

Při dopadu kvant záření (fotonů) vhodné vlnové délky (přibližně od 400 do 700 nm) na asimilační barviva v anténách, dojde v jejich molekulách k **excitaci elektronů**. Jeden foton přitom excituje (= převádí do energeticky bohatšího, ale nestabilního stavu) pouze jeden elektron v jedné molekule. Přbytek energie při návratu elektronu z excitovaného do základního stavu může být jednak přeměněn na teplo či vyzářen ve formě fluorescenčního záření, ale nejčastěji bývá využit k excitaci elektronu v jiné, blízké molekule chlorofylu či karotenoidu. Tímto beztrátovým přenosem **excitační energie (excitonu)** elektronů (nikoli tedy přenosem vlastních elektronů!), označovaným jako induktivní rezonance, může dojít až k transportu excitonu do reakčního centra k ionizovatelné molekule chlorofylu a.

Jednosměrnost přenosu excitační energie z antén směrem k reakčnímu centru fotosystému je zajištěna díky rozdílu ve vlastnostech barviv, které jsou velmi závislé na způsobu své vazby k molekulám bílkovin. Čím blíže k reakčnímu centru se barviva nacházejí, tím menší energii potřebují k excitaci (tedy i jejich maximum absorpce záření leží v poněkud větších vlnových délkách). Tím stoupá pravděpodobnost, že právě na ně bude excitační energie přenesena. Karotenoidy a chlorofyl b potřebují obecně vyšší excitační energii než molekuly chlorofylu a. Přenos excitační energie z antén do reakčního centra probíhá vcelku shodně v obou typech fotosystémů, stejně tak oddělení elektronu v centrální molekule chlorofylu a.



Schématické naznačení excitace elektronu v molekule pigmentů a přenosu excitační energie

Podívejme se ale blíže na reakce, které následují po uvolnění elektronu, neboť ty jsou v obou typech fotosystémů již odlišné.

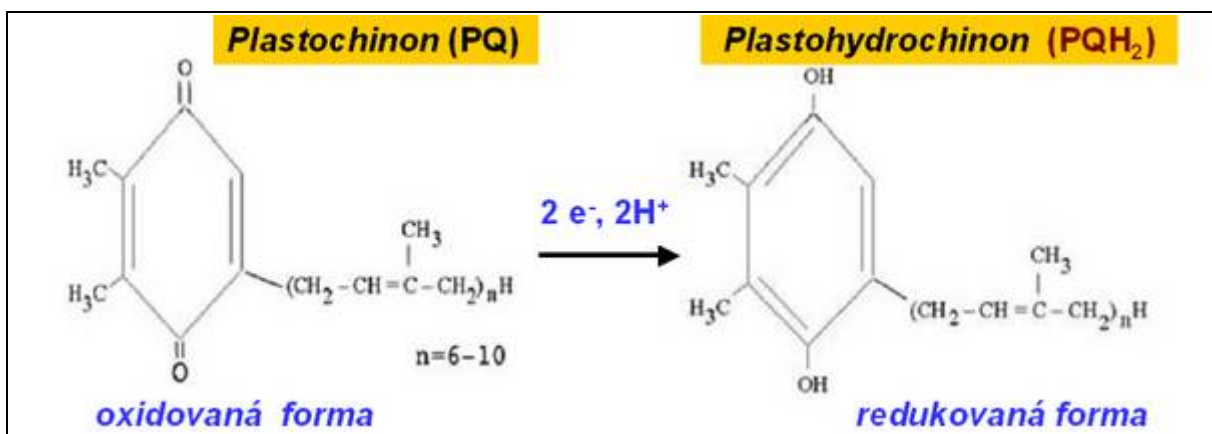
V **reakčním centru fotosystému II** je elektron odštěpený z ionizovatelné molekuly chlorofylu P680 zachycen prvním akceptorem, kterým je **feofytin** (= modifikovaná molekula chlorofylu a bez centrálního atomu hořčíku). Z něho je předáván na další redoxní přenašeče typu **chinonů**. Dva z nich (označované jako **Q<sub>A</sub>** a **Q<sub>B</sub>**), jsou vázané k proteinům reakčního centra. Navazujícími přenašeči jsou volně pohyblivé **plastochinony (PQ)**, které se nacházejí uvnitř membrány okolo fotosystému.



Vraťme se však ještě k molekule chlorofylu P680, která předala svůj elektron. Zpět do původního redukovaného stavu se dostává tím, že přijímá elektron pocházející z rozložené molekuly vody. **Oxidační rozklad vody** je však velmi obtížný proces, který musí být zprostředkován pomocným aparátem. Rozpadem jedné molekuly vody se uvolňují dva elektrony. Měřením bylo zjištěno, že se dokonce současně oxidují dvě molekuly vody, ze kterých se tedy uvolňují čtyři elektrony. Je zřejmé, že přímá oxidace vody aktivovanou molekulou chlorofylu (schopnou akceptovat jen jeden uvolněný elektron) není možná. Proto je v centru oxidace vody důležitá přítomnost iontů manganu se schopností čtyři elektrony naráz přijmout a pak je postupně předávat na chlorofyl P680 prostřednictvím přenašeče označovaného jako  $Y_Z$ , což je zřejmě radikál tvořený tyrosinovým zbytkem na proteinu D1.

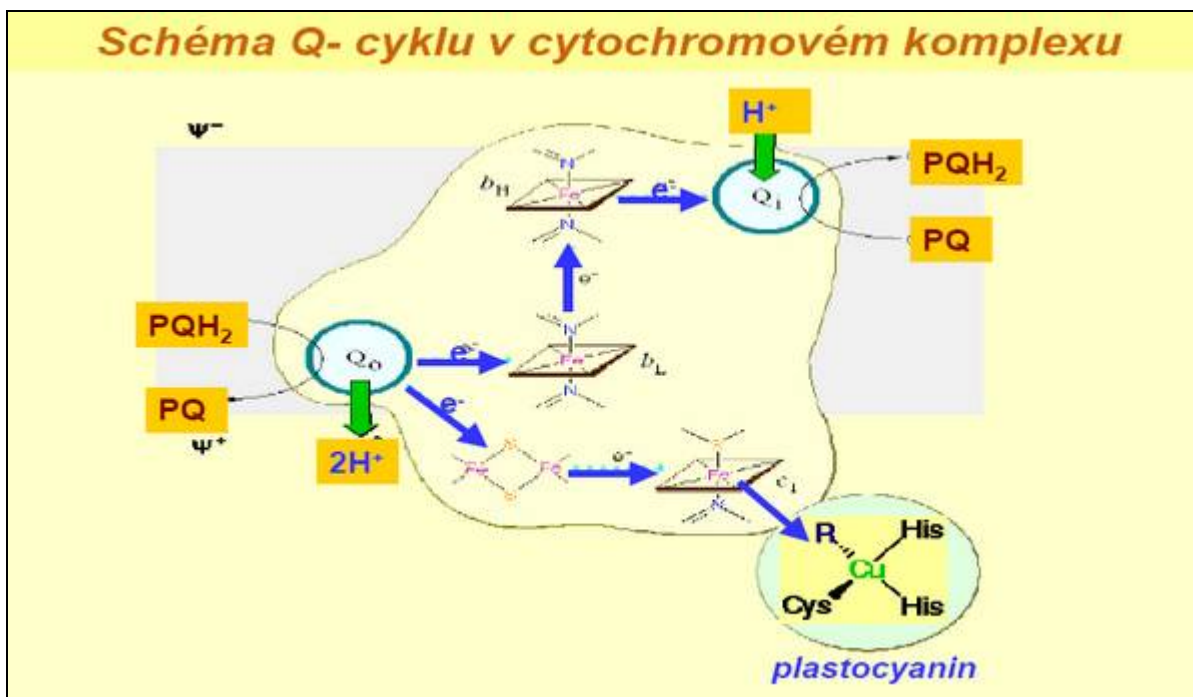
Sledujme však nyní opět cestu elektronů po vazbě na plastochinony. Je důležité si uvědomit, že k redukci plastochinonu na plastohydrochinon jsou potřebné nejen dva elektrony, ale také dva **vodíkové ionty**, které však nepocházejí z fotolýzy vody. Jsou přebírány z vnější strany membrány, ze stromatu, a při dalších redoxních změnách (oxidaci plastohydrochinonu) se v membráně uvolňují na její opačné straně, tedy do lumen. Vidíme tedy, že oxidací jedné molekuly vody a následným přenosem elektronů ve fotosystému II se lumen thylakoidu obohatil o čtyři vodíkové ionty. To je velmi důležité z hlediska celkového energetického výtěžku, jak bude zřejmé z dalšího výkladu.

Přenos elektronů z fotosystému II k cytochromovému komplexu pomocí volně pohyblivých *plastohydrochinonů* (v chloroplastech jich bývá několik druhů) je nejpomalejší proces v celé transportní cestě. Průměrná doba přenosu je asi 5 milisekund, ostatní výměny jsou obvykle o několik řádů rychlejší.



Obecné schéma redukce plastochinonů.

**Cytochromový komplex** je tvořen čtyřmi proteiny, na které jsou navázány čtyři redoxní systémy. U těch ale výměna elektronů není spojena s vazbou vodíkových iontů. Proto při oxidaci volně pohyblivých plastohydrochinonů na tomto komplexu se odpojené protony mohou hromadit ve vnitřní části thylakoidních váček (lumen), spolu s protony produkovanými rozkladem vody ve fotosystému II. Oxidací jedné molekuly hydrochinonu se uvolní dva elektrony, ovšem každý z nich se může ubírat rozdílnými cestami. Jeden je obvykle zachycen redoxním systémem typu Fe-S (na tzv. *Rieskeho proteinu*), pak je přenesen na cytochrom typu  $f$ , a nakonec na mobilní přenašeč **plastocyanin**. Druhý z elektronů bývá zachycen hemovou redoxní skupinou cytochromu typu b, a po přestupu na další cytochrom stejného typu (na téměř proteinu) je uvolněn k redukci některé z volně pohyblivých molekul plastochinonů, a ta je pak opět oxidována na cytochromovém komplexu. Smyslem tohoto cyklického přenosu elektronu, označovaného jako **Q-cyklus** (= chinonový cyklus), je přispět k dalšímu přečerpávání vodíkových iontů z vnější, stromatální strany (odkud se odebírají při redukci plastochinonů) do lumen thylakoidu (kam odcházejí při oxidaci plastohydrochinonu).



Již zmíněný *plastocyanin* (PC), na který dříve nebo později přecházejí všechny elektrony transportované z fotosystému II přes cytochromový komplex, je malý protein (10,5 kDa) ve vodě dobře rozpustný, s redoxní skupinou obsahující měď. Nachází se na vnitřní straně thylakoidní membrány (směrem k lumen) a přenáší elektrony z cytochromového komplexu do *reakčního centra ve fotosystému I*. Jakmile je v tomto centru (za přispění absorbované radiační energie) oxidována centrální molekula chlorofylu *a*, (označovaná jako **P700**), chybějící elektron je doplněn právě z plastocyaninu, neboť ve fotosystému I neprobíhá fotolýza vody (jako možný zdroj elektronů). První akceptor elektronu z P700 je opět molekula chlorofylu *a* (označovaná též jako  $A_0$ ), dalším pak fylochinon ( $A_1$ ), a pak následuje řetěz tří redoxních systémů typu Fe-S (označované jako  $F_X$ ,  $F_A$ ,  $F_B$ ), pevně vázaných na integrálních proteinech reakčního centra. Teprve pak dochází k přenosu elektronu na *ferredoxin* (*Fd*), který se nachází na stromatální straně thylakoidní membrány. Ferredoxin je dobře rozpustný a tudíž pohyblivý protein s obsahem železa. Přenáší elektrony ke konečnému akceptoru v celém řetězci, k  $NADP^+$ , který je redukován na NADPH. Reakce je zprostředkována enzymem *ferredoxin-NADP reduktázou* (zkráceně *Fp*), a spotřebovávají se při ní dva elektrony.

### Feredoxin

na jeho redukované formě jsou závislé tyto reakce v plastidech:

- **redukce NADP na NADPH** (+ *ferredoxin-NADP oxidoreduktáza*)
- **redukce dusitanů na amoniak** (+ *nitritreduktáza*)
- **tvorba glutamátu** z glutaminu a  $\alpha$ -ketoglutarátu, (+ *glutamátsyntáza*)
- **tvorba redukovaného thioredoxinu** (+ *thioredoxin reduktáza*)

V případě nasycení uvedených reakcí může ferredoxin předávat elektrony na:

- **plastochinony** (= cyklický transport elektronů  $\Rightarrow$  tvorba ATP),
- **kyslík** (= *Mehlerova reakce*, je spojena s tvorbou superoxidu, který je rychle rozkládán *superoxiddismutázou*, a vznikající peroxid vodíku je dále rozložen systémem *askorbát - askorbátperoxidáza*).



Celý popsaný přenos elektronů z rozštěpené molekuly vody až na  $\text{NADP}^+$  nazýváme *necyklický (lineární) elektronový transport*. Kromě toho ještě může probíhat *cyklický elektronový transport*. Při něm jsou elektrony uvolněné z excitované molekuly chlorofylu P700 v reakčním centru fotosystému I z přenášeny přes dříve popsaný řetěz pevně vázaných redoxních systémů a mobilní ferredoxin nikoliv k  $\text{NADP}^+$ , ale jsou použity na redukci mobilních plastochinonů v thylakoidní membráně. Po příjmu dvou elektronů se navážou na jednu molekulu plastochinonu i dva protony pocházející ze stromatu. Vzniklý plastohydrochinon je oxidován v cytochromovém komplexu, uvolněné elektrony jsou přenášeny přes jeho redoxní systémy na plastocyanin a pak zpět k P700. Pak mohou opět vstupovat do dalšího cyklu, ovšem protony uvolněné při oxidaci plastohydrochinonu na cytochromovém komplexu již zůstávají v lumen. Popsaný cyklický transport elektronů slouží tedy k "pumpování" vodíkových iontů ze stromatu do lumen. Využívá světelnou energii zachycenou jen ve fotosystému I, a je tudíž zcela nezávislý na fotosystému II a na fotolýze vody. *Nemůže však zcela nahradit necyklický transport s účastí obou fotosystémů, protože jedině tímto transportem se může vytvářet kromě ATP i nezbytně potřebná, energeticky velmi bohatá redukující sloučenina NADPH.*

Jak vyplynulo z předcházejícího popisu, fotolýzou vody a navazujícími redoxními výměnami dochází k rychlému hromadění vodíkových iontů v lumen thylakoidu. Jejich zvýšená volná energie (díky gradientu elektrochemického potenciálu) je průběžně využívána k tvorbě ATP, a sice při průchodu protonů z lumen do stromatu *ATP-syntázou*. Tento polypeptidový komplex se vyskytuje v hojném počtu jen na volných (nepřilehlých) částech thylakoidní membrány, vzhledem k potřebě rychlého přísunu ADP a fosfátových iontů ze stromatu a odvodu ATP tamtéž. K tvorbě jedné molekuly ATP z ADP je nutný průchod tří protonů. Tvorbu ATP na úkor chemického potenciálu vodíkových iontů nahromaděných v lumen při necyklickém (lineárním) elektronovém transportu nazýváme *necyklickou fosforylací* na rozdíl od *cyklické fosforylace*, která využívá energie vodíkových iontů přenesených do lumen ze stromatu při cyklickém elektronovém transportu.

**Optimalizace fotochemické části fotosyntézy**

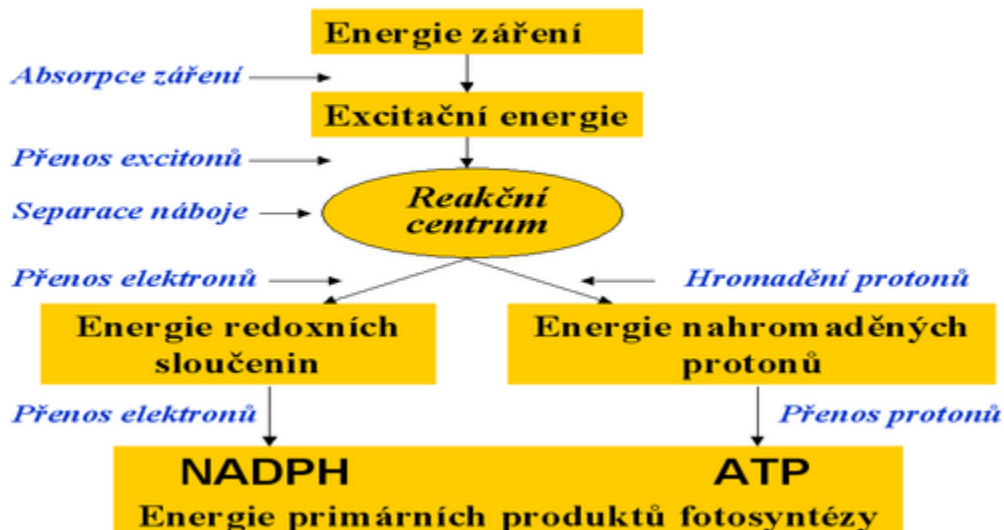
**Proč je pro oxygenní fotosyntézu nutná spolupráce fotosystémů I i II ?**

- Excitovaná molekula chlorofylu P 680 v reakčním centru fotosystému II je relativně slabé redukční činidlo (nepostačuje k redukcí  $\text{NADP}$ ).
- Molekula chlorofylu P700 v reakčním centru fotosystému I je po odtržení elektronu relativně slabé oxidační činidlo (nepostačuje k oxidaci vody).

**Proč je nutné prostorové oddálení obou fotosystémů?**

Přenos excitační energie ve fotosystému I (PS-I) je rychlejší než v PS-II a molekula P700 má menší nároky na excitaci než P680, většina excitonů by tudíž směřovala k P700.

## Přehled typů procesů ve fotochemické části fotosyntézy



## Souhrnné hodnocení průběhu primárních procesů:

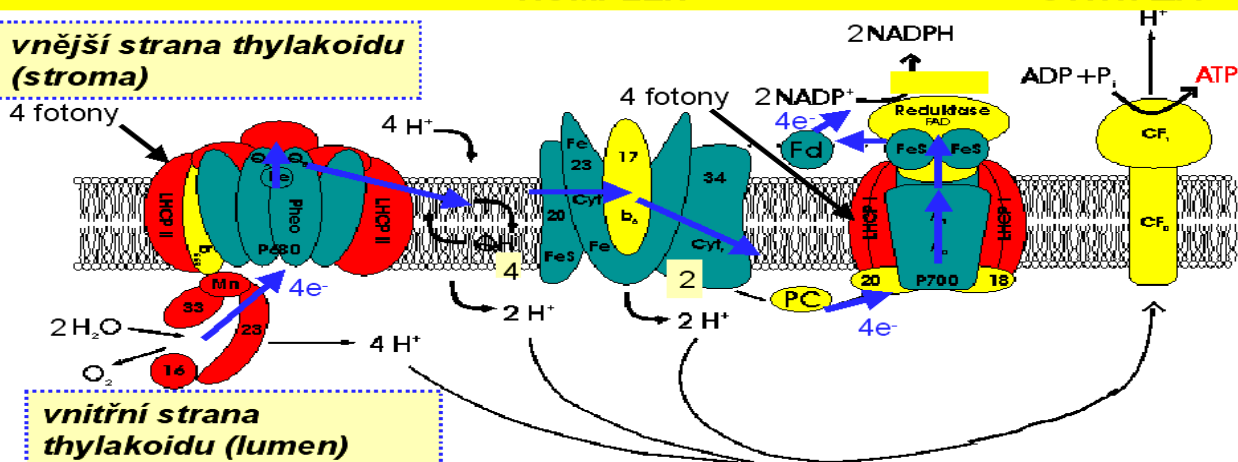
Rozkladem 2 molekul vody se uvolní 4 elektrony, které na konci transportního řetězce redukují 2 molekuly NADP. Při rozkladu vody a následném transportu 4 elektronů (za spotřeby energie 8 fotonů) dojde k obohacení lumen thylakoidu o 10 protonů, což postačuje k tvorbě 3 molekul ATP pomocí ATP-syntázy. (Získané 2 molekuly NADPH a 3 ATP postačují k redukcí 1 molekuly  $\text{CO}_2$ , viz další kapitoly).

### FOTOSYSTÉM II

### CYTOCHROMOVÝ KOMPLEX

### FOTOSYSTÉM I

### ATP SYNTÁZA



## Metodické přístupy ke studiu primárních procesů fotosyntézy

Studium struktury proteinových komplexů v thylakoidních membránách a funkce jejich jednotlivých součástí je mimořádně obtížné a ještě zdaleka není ukončeno. Potíže vyplývají nejen ze složitosti a funkční propojenosti těchto struktur, ale hlavně z toho, že jsou to struktury, jejichž nenarušená vazba v membránách je podmínkou správné funkce. Běžné biochemické metody jsou proto použitelné jen ve velmi omezené míře. Mnohem větší význam mají moderní biofyzikální metody umožňující provádět analýzy nedestruktivním způsobem na živých, plně funkčních částech rostlin. Detaily „architektury“ fotosystémů, zejména tedy prostorové struktury reakčních center a anténních protein-pigmentových shluků, jsou nejčastěji studovány pomocí *rentgenové krystalografie*. K výzkumu funkční významnosti jednotlivých proteinů v komplexech také velmi pomáhají vhodné aplikace

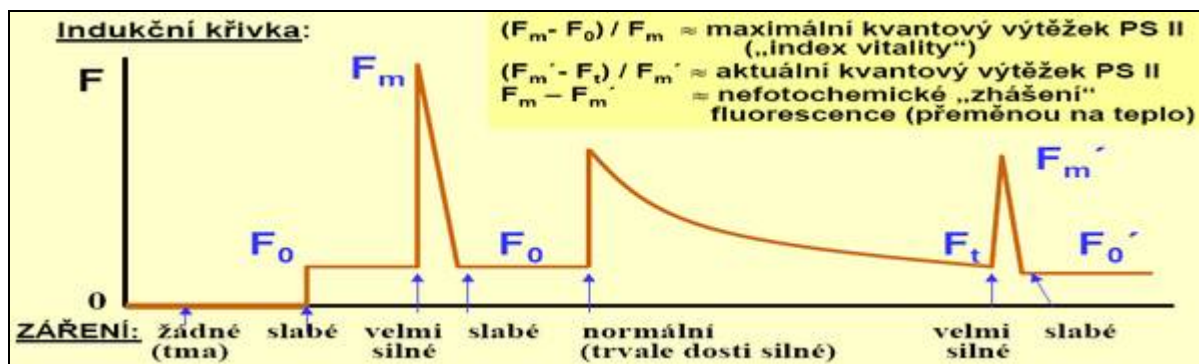
metod *molekulární biologie*, např. cílenou tvorbou geneticky modifikovaných rostlin s různě defektní stavbou fotosystémů.

Ke stanovení celkové funkčnosti fotochemického aparátu rostlin i k analýze dílčích procesů zapojených do konverze energie záření do chemické formy energie jsou v současné době nejvíce používány **metody založené na detekci a následné analýze signálu indukované fluorescence chlorofylu**. Jsou to metody velmi rychlé, aplikovatelné jak na buněčné tak i na orgánové úrovni, a navíc snadno použitelné i v terénních podmínkách. Proto bychom měli znát jejich obecný princip a některé oblasti jejich využití.

Jak již bylo v předcházejícím výkladu naznačeno, jeden elektron v molekule chlorofylu po absorpci dávky záření (fotonu) je uveden do energeticky bohatšího stavu, ze kterého se rychle vrací zpět do stavu základního. Přebytek jeho energie při tomto návratu je většinou využit k fotochemickým procesům (transport elektronů z reakčního centra a tvorba NADPH), ale může také posloužit ke vzniku nového záření (= fluorescenční záření, má poněkud větší vlnovou délku než to, které bylo absorbováno). Je ale také možná přeměna excitační energie na tepelnou energii. Tyto *tři deexcitační cesty jsou ve vzájemném kompetičním vztahu*, tudíž snížení aktivity jedné z nich vede k relativnímu zvýšení úhrnného podílu zbývajících dvou cest. Tedy naměříme-li u studovaného listu snížení fluorescence chlorofylu, lze z toho usuzovat jednak na zvýšenou aktivitu fotochemických procesů, ale také může jít o zvýšení tepelného rozptylu (disipace) excitační energie, která pak již nemůže být využita ve fotochemických procesech fotosyntézy). V odborné fluorometrické terminologii se tyto dva kompetiční procesy ovlivňující fluorescenci označují jako fotochemické zhášení (angl. *quenching*) fluorescence, a nefotochemické zhášení fluorescence.

K přesnému měření fluorescence existuje dnes celá řada velice citlivých, snadno přenosných přístrojů, které obvykle mají vlastní zdroj záření pro regulovanou indukci (vybuzení) fluorescence. Nejvýznamnějším problémem při fluorometrických měřeních však není přesné stanovení hustoty toku fluorescenčního záření vyzařovaného z měřeného objektu (ten lze zaznamenávat automaticky i po velmi dlouhý časový interval!), ale analýza získaných dat, neboť z nich je nutno *odděleně vypočítat podíl fotochemické a nefotochemické složky na celkovém zhášení fluorescence*. Jen pak mohou fluorometrická měření posloužit k hodnocení aktivity primárních (fotochemických) procesů v rostlinách, na kterých nám nejvíc záleží.

Pro oddělené stanovení podílu obou zmíněných složek je nutno zvolit takový měřicí postup, při kterém je jedna z nich konstantní, či ještě lépe po jistou dobu zcela potlačena. Podíl fotochemického zhášení fluorescence lze eliminovat *zablokováním přenosu elektronů v thylakoidní membráně*, což lze provést nejen aplikací chemických inhibitorů redoxních systémů, ale i (což je v praxi nejčastější) *krátkým působením záření o vysoké (nadsaturační) rychlosti toku*. V tom případě dojde k úplné redukci redoxních přenašečů ve fotosystémech a ty po jistou dobu nejsou schopny přijímat žádné další elektrony. Jeden z nejjednodušších postupů při získávání základních údajů o aktuálním i potenciálním stavu asimilačního aparátu je schematicky znázorněn na obrázku a blíže popsán v dalším textu.





Měření obvykle začínáme se vzorkem (rostlinou, listem či částí listu) který byl po dobu několika desítek minut před měřením zatemněn. Tím je navozen plně oxidovaný stav redoxních systémů v thylakoidních membránách, které jsou tudíž schopné po ozáření vzorku rychle přenášet elektrony z reakčního centra. Pokud záření je jen velmi nízké, je relativní hodnota emitované fluorescence také velmi nízká (označuje se jako  $F_0$ , ale také jako bazální či „nulová“ fluorescence). Poté je aplikován krátký puls velmi vysokého záření, při kterém je velkým množstvím uvolněných elektronů v reakčním centru dočasně zablokovan jejich transport, neboť není dostatek volných akceptorů (t.j. redoxních přenašečů v oxidovaném stavu, vše je náhle plně redukováno), ale přitom mechanismy nefotochemického zhášení fluorescence (tepelné disipace) nejsou ještě za tak krátkou dobu aktivovány. Část energie, která by se u rostliny s nezablokovanými přenašeči mohla fotochemicky využít, je přeměněna na mimořádně vysokou („maximální“) fluorescenci ( $F_m$ ). Normalizovaný rozdíl fluorescence od  $F_0$  až po  $F_m$  je tak mírou maximální (potenciální) rychlosti transportu elektronů ve fotosystémech a za jistých předpokladů může sloužit i k odhadu kvantového výtěžku fotosystému II.

Po zjištění uvedených základních parametrů můžeme měřený list vystavit středním hodnotám záření (které jsou běžné v přírodě) a opakovaně aplikovat krátké pulzy velmi vysokého záření ke zjištění parametru  $F'_m$ , což je hodnota maximální fluorescence při dlouhodobém vystavení listu záření. (na našem obrázku je znázorněn pouze jeden takový puls). V časovém intervalu několika desítek minut se postupně aktivují nefotochemické mechanismy zhášení (způsobující tepelnou disipaci jisté části excitační energie) a rozdíl mezi  $F_m$  a  $F'_m$  lze považovat za míru jejich aktivity.

Měření a následná analýza signálu fluorescence chlorofylu může být používána v základním výzkumu fotosyntetických procesů, např. k hlubší analýze rychlosti jednotlivých kroků a k hledání nejvíce limitujících míst v transportním řetězci (zejména pomocí přístrojů umožňujících měřit extrémně rychlé změny v emitovaném fluorescenčním záření). Daleko nejčastěji jsou však měření indukované fluorescence používána v ekologické fyziologii rostlin k velmi rychlé a snadné detekci významnosti vlivu různých stresových faktorů na rostliny. Nemusí to být pouze faktory ovlivňující přímo funkčnost fotosyntetického aparátu (např. nízká či vysoká teplota, nadměrné záření, plynné polutanty). *I nepřímé vlivy vedoucí ke zpomalení růstu (např. nedostatek vody či živin vedoucí ke zpomalení růstu) se dříve nebo později projeví v malém „odbytu“ vytvářených asimilátů, a jejich postupné hromadění v chloroplastech vede v první řadě k inhibici biochemických procesů fixace  $CO_2$ . Pak obvykle následuje i malá „poptávka“ po produktech fotochemických procesů (ATP, NADPH), a tedy i zpomalení rychlosti fotochemických procesů, a to je už fluorometricky měřitelné.*

Relativní dostupnost kompaktních aparatur pro měření indukované fluorescence chlorofylu *in vivo* a jejich téměř masové nasazení v různých oblastech základního i aplikovaného fyziologického výzkumu lze jen uvítat, avšak současně svádí k mnoha *chybným aplikacím*. Především je nutno mít stále na paměti, že se jedná vesměs o relativní měření změn ve funkčnosti primárních procesů v měřeném vzorku, stěží použitelné ke srovnávacím účelům, tedy k nalezení spolehlivých rozdílů mezi různými listy či druhy. Vyvozovat z fluorometrických měření závěry týkající se rychlosti sekundárních fotosyntetických procesů (fixace  $CO_2$ ) je také velmi nespolehlivé – korelace zjišťované v laboratorních podmínkách nemusí vůbec platit pro rostliny v přírodě. V tomto směru jsou metody založené na měření výměny plynů (především příjmu a výdeje  $CO_2$ ) stále nenahraditelné. Avšak i při jednoduchých detekcích opakovaně prováděných na týchž listech velmi záleží na správném (předem navrženém a vyzkoušeném) experimentálním postupu, protože *špatně naměřená data nelze uspokojivě vyhodnotit a jakékoli snahy o jejich interpretaci jsou velmi zavádějící.*

## Biochemické procesy asimilace oxidu uhličitého, fotorespirace

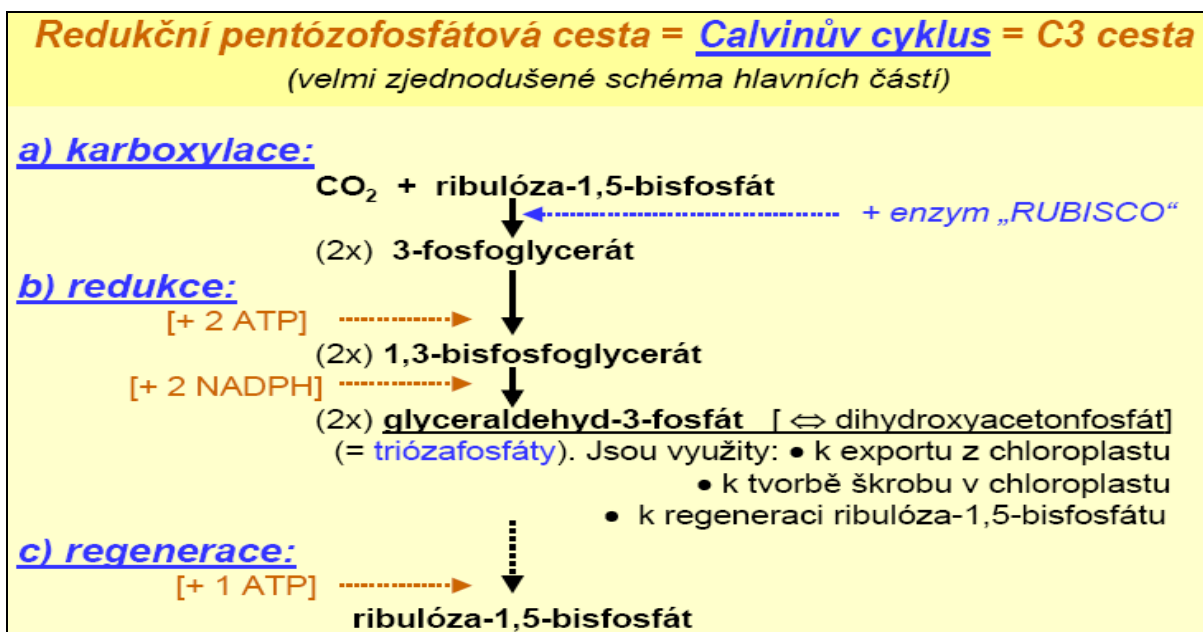
Na popsané primární procesy v thylakoidních membránách navazuje celá řada syntetických procesů, z nichž nejdůležitější je asimilace  $\text{CO}_2$  do organických sloučenin. K tomu slouží komplex biochemických reakcí probíhajících tentokrát ve stromatu chloroplastu. Reakce jsou spojeny do uzavřeného koloběhu, který souhrnně označujeme jako **fotosyntetický cyklus redukce uhlíku**, nebo též **Calvinův cyklus**. Nebudeme jej zde podrobně popisovat, neboť to je již problematika čistě biochemická. Zopakujme si tedy jen opravdu to nejdůležitější. Calvinův cyklus lze rozdělit na tři etapy:

**Karboxylace:**  $\text{CO}_2$  je vázán na pětiuhlíkatý fosforylovaný cukr ribulóza-1,5-bisfosfát pomocí enzymu ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza. Prvním stálým produktem této reakce, která probíhá bez dodání energie, jsou dvě molekuly kyseliny 3-fosfoglycerové (3-PGA).

**Redukce:** Nejprve se na 3-PGA napojuje další fosfátová skupina uvolněná hydrolyzou molekuly ATP. Vzniká tak kyselina 1,3-bisfosfoglycerová a pak dochází k vlastní redukci pomocí NADPH za vzniku glycerinaldehyd-3-fosfátu. Protože při fixaci jedné molekuly  $\text{CO}_2$  vznikly dvě molekuly 3-PGA, bude celkový náklad na jejich redukci 2 ATP a 2 NADPH.

**Regenerace:** Nejsložitější fáze celého cyklu ve které reakce fosforylovaných cukrů vedou k syntéze ribulóza-5-fosfátu. Ten je nutno další molekulou ATP (třetí v celkovém součtu) převést na ribulóza-1,5-bisfosfát, který pak slouží jako akceptor pro další molekulu  $\text{CO}_2$ .

K čistému zisku jedné tříuhlíkaté molekuly (glycerinaldehyd-3-fosfátu) je zapotřebí fixovat tři molekuly  $\text{CO}_2$ , tedy celý cyklus musí proběhnout třikrát. Vytvořený glycerinaldehyd-3-fosfát je jednak zpracováván v dalších syntézách přímo v chloroplastu (např. na škrob), jednak je transportován z chloroplastu do cytosolu. Na transportu se může podílet také blízký příbuzný dihydroxyacetonfosfát, který vzniká snadnou izomerací z glycerinaldehyd-3-fosfátu.



Calvinův cyklus je evolučně velmi starý proces, společný všem fotosyntetizujícím organismům. *Žádný jiný cyklus se srovnatelnou funkcí není znám*, avšak je známa celá řada přidavných reakcí, které fungování Calvinova cyklu mohou zefektivnit anebo přizpůsobit zvláštním podmínkám.

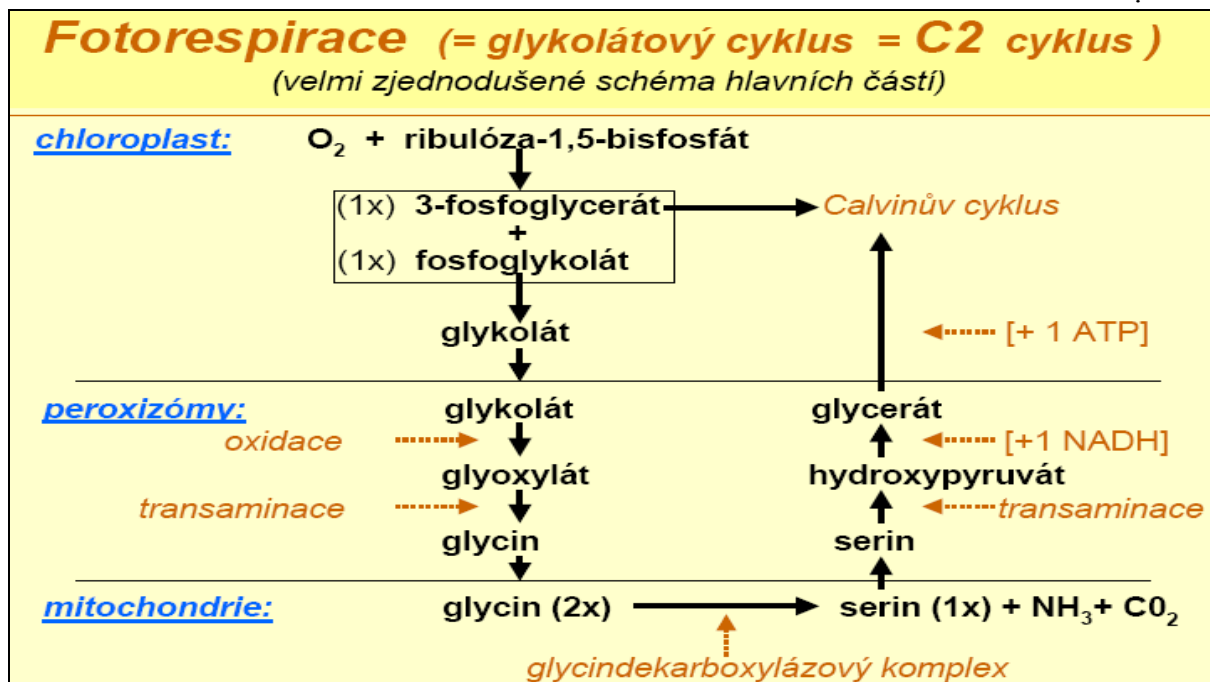
Hlavním enzymem Calvinova cyklu je **ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza**, běžně označovaná akronymem "**Rubisco**". Může fungovat, jak už jeho název napovídá, nejen jako karboxyláza, ale i jako oxygenáza, tedy na stejný substrát vnášet buď  $\text{CO}_2$ , nebo  $\text{O}_2$ .

V listech rostlin má největší zastoupení ze všech proteinů (30 až 50 %). Katalytické schopnosti *Rubisco* jsou aktivovány pouze na světle za přítomnosti  $Mg^{2+}$  a  $CO_2$ , které s ním vytvářejí pevný komplex. Tento proces (*karbamylace Rubisco*) je stimulován specifickým enzymem *Rubisco* aktivázou. U některých druhů se vyskytuje ještě další specifická sloučenina, která řídí (tentokrát inhibuje) aktivitu *Rubisco*: 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát. Dokonalá regulace aktivity *Rubisco* a některých dalších enzymů v Calvinově cyklu je zřejmě nutná ke sladění návaznosti reakcí a k omezení oscilací v cyklu na počátku světelné periody.

Afinita *Rubisco* k  $CO_2$  je sice podstatně větší než ke kyslíku, jenže v chloroplastech bývá mnohem vyšší koncentrace kyslíku než  $CO_2$ . Za takových podmínek se oxygenázová aktivita skutečně významným způsobem projeví - spouští celý řetěz reakcí, které souhrnně označujeme jako fotorespirační cyklus oxidace uhlíku, zkráceně fotorespirace.

**Fotorespirace** začíná tedy přenosem kyslíku pomocí *Rubisco* na stejný substrát, jako při karboxylaci (ribulóza-1,5-bisfosfát). Stálým produktem této reakce je jedna molekula 3-PGA a jedna molekula fosfoglykolátu. Z ní se záhy odštěpuje fosfátová skupina a vzniklý glykolát je transportován z chloroplastu do blízkých peroxisomů. Tam je oxidován na glyoxylát a ten dále transaminován na glycin. Na tyto reakce v peroxizómu navazují další, tentokrát v mitochondriích: tvorba jedné molekuly serinu ze dvou molekul glycinu - uvolňuje se při tom po jedné molekule  $CO_2$  a  $NH_3$ . Serin může být jednak využíván v dusíkovém metabolismu buňky (syntéza dalších aminokyselin, bílkovin a jiných složitějších látek), ale může být také transportován zpět do peroxisomů, kde po transaminaci a redukci (za spotřeby jedné molekuly NADH) vzniká glycerát. Ten se v chloroplastech fosforyluje za účasti jedné molekuly ATP na 3-fosfoglycerát, který může být využit k regeneraci původního substrátu, ribulóza-1,5-bisfosfátu. Tím se celý cyklus uzavírá.

Je dobré si povšimnout, že z každých dvou dvouuhlíkatých molekul glykolátu (tedy celkem 4 C), které vystupují z chloroplastu do řetězu fotorespiračních reakcí, se vrací zpět jen jedna tříuhlíkatá molekula glycerátu, tedy jen 75% C. Zbylá čtvrtina uhlíku se ztrácí ve formě  $CO_2$ . Při přepočtu na výchozí substrát (ribulóza-1,5-bisfosfát) činí ztráta uhlíku 10%, ovšem přistupují ztráty energetické (2 ATP a 2,5 NAD(P)H na každou fixovanou molekulu  $O_2$ ).



Schopnost enzymu *Rubisco* přenášet nejen  $CO_2$ , ale i  $O_2$  na tentýž substrát, má obvykle za následek značné snížení účinnosti fotosyntetické fixace  $CO_2$ . Poměr mezi



karboxylační a oxygenační aktivitou tohoto enzymu závisí především na poměru mezi koncentrací CO<sub>2</sub> a kyslíku v chloroplastu. Tento poměr je zase velmi závislý na koncentraci obou plynů v atmosféře. Za normálního složení vzduchu v okolí listu (21 objemových % O<sub>2</sub> a 0,036 % CO<sub>2</sub>), a při teplotě listu 25 °C, je teoretický poměr mezi rychlostí oxygenace a karboxylace (vypočítaný z afinitních konstant obou enzymů) asi 2,5. To by naznačovalo že asi jedna čtvrtina primárního substrátu využitelného v Calvinově cyklu podléhá fotorespiračním procesům a tedy i ztrátám (uhlíku, energie), jak již bylo uvedeno.

Výsledky měření rychlosti fotorespirace za reálných podmínek v listu, získané pomocí moderních metod s využitím značeného kyslíku (<sup>18</sup>O<sub>2</sub>), umožňujících přesně stanovit množství kyslíku přenášeného enzymem *Rubisco*, nás nutí značně přehodnotit naše původní představy o významnosti fotorespirace, postavené jen na zjednodušených, teoretických předpokladech. Bylo totiž zjištěno, že *poměr mezi karboxylační a oxygenační aktivitou Rubisco v listech běžných rostlin (s fixační cestou C<sub>3</sub>) bývá velmi často vyrovnaný (1:1)*, a to i za normální koncentrace plynů v atmosféře. Hlavním důvodem jsou zřejmě značně rozdílné koncentrace plynů v chloroplastu ve srovnání s okolním vzduchem - kyslík je totiž produkován ve velkém množství přímo v chloroplastech štěpením vody, zatímco CO<sub>2</sub> tam musí pronikat složitější cestou. To tedy znamená, že **fotorepirační ztráty mohou dosahovat až 50%!** Při zvyšování teploty listu poměr mezi koncentrací CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> v chloroplastech dále klesá, neboť CO<sub>2</sub> má za vyšších teplot menší rozpustnost ve vodě než kyslík. *Podíl oxygenace, a tudíž i fotorepiračních ztrát, tedy nutně vzrůstá i s teplotou.*

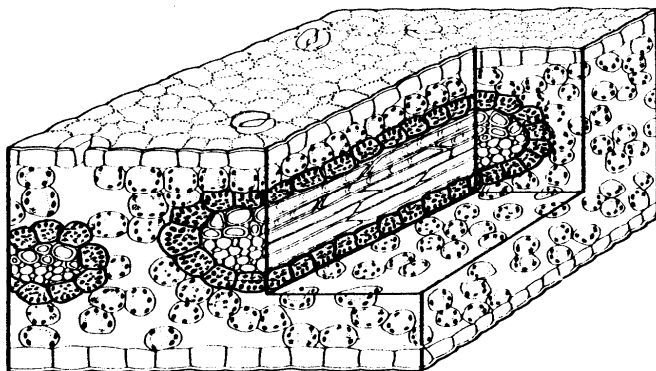
Negativní vliv fotorespirace na celkovou efektivitu fixace CO<sub>2</sub> je sice nepochybný, ale pro celkové fungování rostliny není zcela jistě jen pouhým ztrátovým procesem, se kterým si evoluce "nevěděla rady". *Všechny možné "benefity" fotorespirace dosud neznáme*, neboť jsou často jen kvalitativního charakteru a tudíž sotva ocenitelné měřítky zisku energie či uhlíku. Právě fotorepirační cestou se vytváří nejvíce aminokyselin glycinu a serinu. Také je již známo, že rostliny s uměle potlačenou fotorespirací mají silně inhibované procesy asimilace anorganického dusíku i tvorbu některých organických kyselin. Fotorespirace může také být velmi prospěšná cesta k odvádění přebytků ATP a redukčního potenciálu za silného záření či nedostatku CO<sub>2</sub> (např. při přivření průduchů za nedostatku vody). V takových případech může být v chloroplastech zachován dostatečně rychlý průběh primárních procesů fotosyntézy, a tudíž i zpracování radiační energie absorbované v asimilačních pigmentech. Její nadbytek by mohl vést k poškození fotosyntetického aparátu. Ve srovnání s jinými fotoprotektivními mechanismy může fotorespirace zajistit ochranu mnohem rychleji.

## Fixační cesta C<sub>4</sub>

I když v průběhu evoluce rostlin nevznikl kromě Calvinova cyklu žádný jiný fixační cyklus s tak dokonalou obnovou všech reagujících složek, a také ani nedošlo k výraznému zlepšení vlastností klíčového enzymu *Rubisco*, přesto jisté změny v metabolických cestách u řady druhů skutečně nastaly. Bylo již objeveno několik pozoruhodných metabolických adaptací, které v první řadě umožňují zvýšit parciální tlak CO<sub>2</sub> v místech jeho fixace Calvinovým cyklem a tím potlačit oxygenázovou aktivitu *Rubisco*. Společným principem těchto adaptací u suchozemských rostlin je opakovaná karboxylace, u vodních (ponořených) rostlin pak ještě navíc *aktivní* transport iontů HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> z vodního prostředí do listů.

Nejprve se podívejme, jak funguje nejvíce rozšířená metabolická adaptace označovaná jako **fixační cesta C<sub>4</sub>**. U rostlin s tímto typem metabolismu (zkráceně **C<sub>4</sub>-rostliny**) jsou chloroplasty se schopností fixace běžným Calvinovým cyklem soustředěny jen do skupin zvláštních buněk, které mají ztlustlé stěny a malé vakuoly. Zato chloroplastů a mitochondrií mají mimořádně velký počet. Tyto zvláštní buňky vytvářejí jednu až dvě koncentrické vrstvy kolem cévních svazků. Jsou velmi nápadné a říká se jim též věnce či **pochvy cévních svazků**.

Ostatní mezofylové buňky mají chloroplasty menší, méně početné, bez škrobových zrn, zato s velkým počtem granálních tylakoidů. Hlavně však mají zcela jinou funkci při sekundárních procesech fotosyntézy. Nejvíce chloroplastů bývá v těch mezofylových buňkách, které leží v těsné blízkosti zvláštních buněk pochev cévních svazků, neboť mezi oběma typy buněk je nutná velmi těsná spolupráce.



Průřez částí listu rostliny s fixační cestou  $C_4$ . Buňky pochvy cévních svazků, kde probíhá konečná fixace  $CO_2$  do sacharidů, jsou zvýrazněny.

K prvotní karboxylaci dochází vždy v cytosolu běžných mezofylových buněk. Jsou při ní využívány ionty  $HCO_3^-$ , které se v cytosolu vyskytují hojněji než rozpuštěný  $CO_2$ . Navazují se na tříuhlíkatý fosfoenolpyruvát za vzniku oxalacetátu (kyseliny oxaloctové). *Primární produkt reakce je tedy čtyřuhlíkatá sloučenina - proto označujeme tuto fixační cestu jako  $C_4$*  (na rozdíl od přímé fixace Calvinovým cyklem, označované jako  $C_3$ -fixační cesta, neboť prvním stálým produktem je tříuhlíkatá kyselina fosfoglycerová).

Enzymem katalyzující reakci je **fosfoenolpyruvátkarboxyláza** (zkráceně **PEP karboxyláza**), která má k  $CO_2$  větší afinitu než *Rubisco*. Tím je také možný rychlejší příjem  $CO_2$  do listu i při stejné vodivosti difuzních cest.

Další reakce, které následují po prvotní karboxylaci, mohou vést několika směry. U jedné skupiny  $C_4$ -rostlin, ke které patří např. kukuřice, vzniklý oxalacetát vstupuje do chloroplastů mezofylových buněk, kde se velmi rychle redukuje na malát. Ten je pak transportován do zvláštních buněk v pochvách cévních svazků, kde dochází k oxidativní dekarboxylaci na pyruvát. Uvolněný  $CO_2$  je postupně zpracováván Calvinovým cyklem. Zbylý pyruvát je odváděn zpět do mezofylových buněk k využití v dalším fixačním cyklu.

U jiné skupiny  $C_4$ -rostlin (některé tropické trávy, např. rodu proso, *Panicum*) je oxalacetát v cytosolu transaminován na **aspartát** (donorem aminoskupiny je glutamát), který je pak transportován do zvláštních buněk v pochvách cévních svazků. Tam je nejprve opět přeměněn na oxalacetát, který je buď přímo dekarboxylován, nebo je nejprve redukován na malát a pak teprve dekarboxylován. Ve všech případech je uvolněný  $CO_2$  ve zvláštních buňkách pochev cévních svazků dále zpracováván Calvinovým cyklem. Zbylé produkty (pyruvát či alanin) jsou transportovány zpět do mezofylových buněk a regenerací primárního akceptoru se cyklus uzavírá.

Fixační cesta  $C_4$  je z hlediska využití  $CO_2$  neobyčejně účinná. Nejen proto, že v mezofylu je  $CO_2$  (resp.  $HCO_3^-$ ) velmi rychle a účinně vázán PEP karboxylázou na fosfoenolpyruvát, ale hlavně proto, že v buňkách pochev cévních svazků vzniká dekarboxylací organických kyselin velmi vysoká koncentrace  $CO_2$  (asi  $1500 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ , což je téměř desetkrát více, než bývá v mezofylových buňkách  $C_3$ -rostlin!) *Zvýšenou koncentrací  $CO_2$  je téměř úplně potlačena oxygenázová aktivita *Rubisco**, a tím tedy i fotorespirace. Chloroplasty v buňkách pochev cévních svazků mají velmi málo gran, tudíž i malé zastoupení tylakoidních membrán s fotosystémem II. Proto i produkce kyslíku rozkladem vody je poměrně malá.

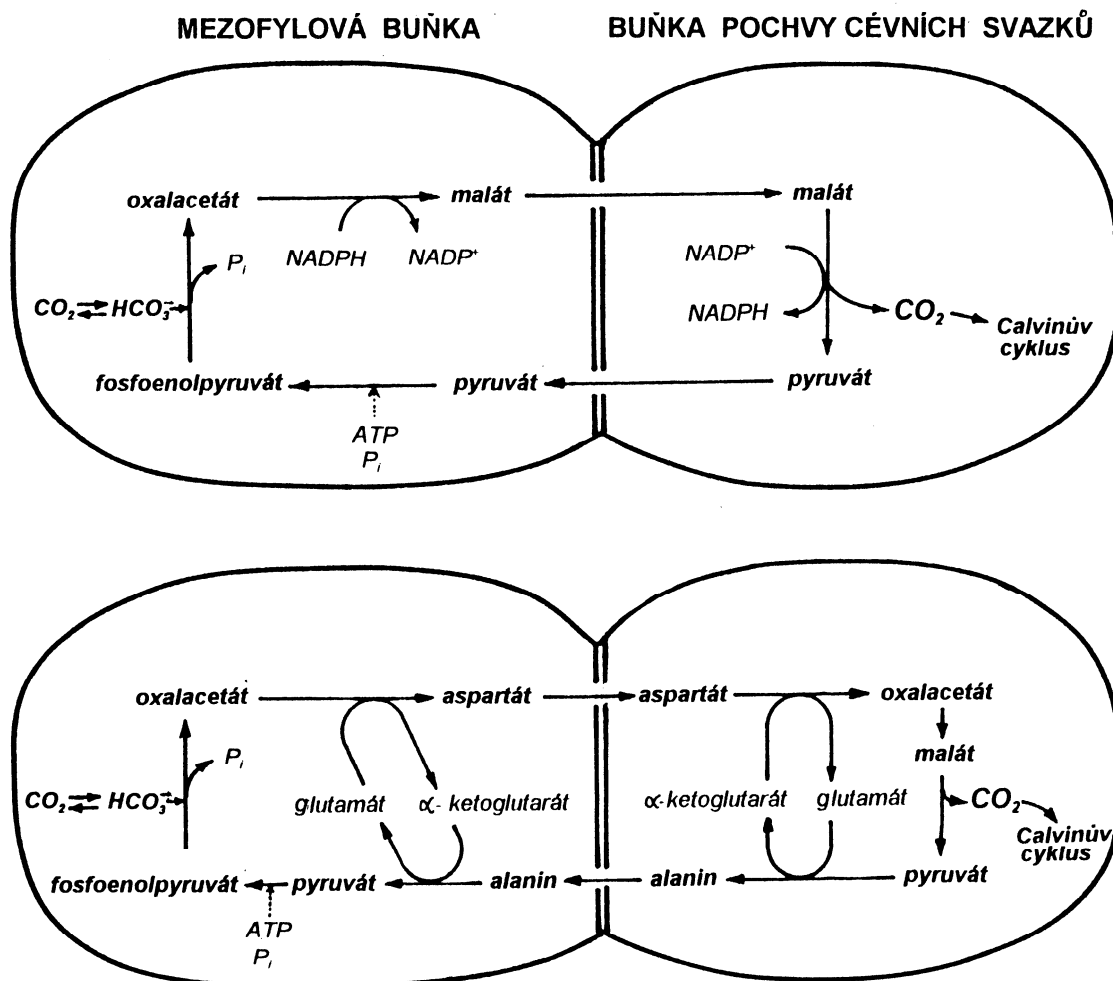


Schéma dvou variant fixační cesty C<sub>4</sub>: varianta s transportem malátu (nahore) a s transportem aspartátu (dolní část obrázku). Existují i další modifikace C<sub>4</sub>-metabolismu.

Na druhé straně však celý mechanismus umožňující zvyšovat koncentraci CO<sub>2</sub> v oddělené skupině buněk schopných jeho vazby Calvinovým cyklem vyžaduje jisté dodatečné provozní náklady. Na každou fixovanou molekulu CO<sub>2</sub> je nutno vynaložit energii nejen tří molekul ATP v Calvinově cyklu, ale ještě navíc 1 až 2 ATP na regeneraci fosfoenolpyruvátu. Z toho můžeme usoudit, že rostliny s fixační cestou C<sub>4</sub> mohou být zvláště úspěšné za podmínek, kdy příkon zářivé energie (pro tvorbu ATP v primárních procesech) není limitující, a kdy omezujícím faktorem je spíše nedostatečný přísun CO<sub>2</sub> do listu. Také za vyšší teploty, která zvyšuje u C<sub>3</sub>-rostlin fotorespirační ztráty, je výhodnější cesta C<sub>4</sub>.

Je proto pochopitelné, že nejvíce druhů rostlin s fixační cestou C<sub>4</sub> nacházíme v tropických a subtropických zemích. Celkem se jedná asi o tisíc druhů z 16 čeledí, u kterých byl tento typ metabolismu dosud dokázán. Nejpočetnější skupinu tvoří tropické trávy (včetně hospodářsky významných druhů, jako je proso, cukrová třtina a kukuřice), ale také asi 300 druhů dvouděložných bylin. C<sub>4</sub>-cesta se nevyskytuje u řas, mechů a nahosemenných, ani u většiny listnatých stromů a keřů. V naší flóře (pokud nepočítáme zmíněnou introdukovanou kukuřici, proso a některé zavlečené plevelné trávy) se vyskytují rostliny C<sub>4</sub> jen zcela výjimečně. Jde především o nepočetnou skupinu druhů teplomilných trav (např. rodů *Digitaria*, *Bothriochloa*, *Setaria* a *Cynodon*).



**Taxonomické skupiny rostlin s největším zastoupením druhů s fixační cestou C<sub>4</sub>:**

Čeleď	počet rodů s C <sub>4</sub>	počet druhů s C <sub>4</sub>
<b>Jednoděložné:</b>		
Lipnicovité ( <i>Poaceae</i> )	372	4600
Šáchorovité ( <i>Cyperaceae</i> )	28	1330
<b>Dvouděložné:</b>		
Merlíkovité ( <i>Chenopodiaceae</i> )	45	550
Laskavcovité ( <i>Amaranthaceae</i> )	13	250
Hvězdicovité ( <i>Asteraceae</i> )	8	150
Přýšcovité ( <i>Euphorbiaceae</i> )	1	150
Rdesnovité ( <i>Polygonaceae</i> )	1	80
Šruchovité ( <i>Portulacaceae</i> )	2	70
Kacibovité ( <i>Zygophyllaceae</i> )	3	50
Hvozdíkovité ( <i>Caryophyllaceae</i> )	1	50
<b>Rarity:</b> <i>Haloxylon aphyllum</i> (merlíkovité) – dřevina <i>Borszczovia aralocaspica</i> , <i>Bienertia cycloptera</i> – jen 1 typ buněk		

## Fixační cesta CAM

Ve velmi rozsáhlé a taxonomicky rozmanité skupině sukulentních rostlin nacházíme další zajímavou metabolickou variantu fotosyntetické asimilace CO<sub>2</sub>, označovanou jako fixační cesta CAM (z angl. *Crassulacean Acid Metabolism*, neboť byla poprvé zjištěna u rostlin čeledi tlusticovitých, *Crassulaceae*). Také zde, obdobně jak u rostlin C<sub>4</sub>, dochází nejprve k vazbě HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> na fosfoenolpyruvát a v druhé fázi ke karboxylaci v Calvinově cyklu. Celá řada dalších znaků je však zcela specifická.

První zvláštnost spočívá v tom, že **oba karboxylační procesy probíhají v těže buňce**. Nejsou odděleny prostorově, ale zato časově - neprobíhají současně.

Dalším svérázným znakem je prvotní karboxylace v cytosolu zprostředkovaná PEP-karboxylázou. Probíhá totiž **pouze v noci**. Na rozdíl od C<sub>4</sub>-rostlin neprobíhá současně dekarboxylace, a tak substrát pro karboxylaci (fosfoenolpyruvát) nemůže být doplňován z uzavřeného cyklu. Musí být tudíž obstaráván glykolýzou a přídavnými reakcemi ze škrobu.

Třetím rysem je **hromadění kyseliny jablečné** (která vzniká z primárního produktu karboxylace, oxalacetátu) v průběhu noci ve velkých vakuolách. Její koncentrace může dosahovat až 0,3 M, a pH vakuolární šťávy klesá až k hodnotě 4. Pro správnou funkci cesty CAM je proto velmi důležitá jednak dostatečná velikost vakuoly, ale i schopnost tonoplastu udržet obrovský koncentrační rozdíl ve vodíkových iontech mezi vakuolou a cytosolem.

Konečně čtvrtou specifitou je **regulace druhé fixace** CO<sub>2</sub>. Za světla je kyselina jablečná transportována do cytosolu, kde je dekarboxylována. Uvolněný CO<sub>2</sub> je v chloroplastech využit Calvinovým cyklem. Nyní se však oprávněně můžeme ptát, proč je CO<sub>2</sub> na světle spotřebováván právě Calvinovým cyklem, když je přítomna i účinnější PEP-karboxyláza?

*Správná funkce fixační cesty CAM a časová posloupnost jednotlivých reakcí je podmíněna dokonalou regulací aktivity enzymů.* Zdaleka ne všem regulačním mechanismům rozumíme. Víme však, že PEP-karboxyláza se v rostlinách s fixační cestou CAM vyskytuje **ve dvou reverzibilních formách**. Za tmy je to forma aktivní (dokonale funkční a navíc necitlivá ke koncentraci malátu). Působením záření však přechází do formy inaktivní (s velmi malou afinitou k CO<sub>2</sub> a ta je ještě navíc silně inhibována přítomností malátu). Tyto změny jsou provázány fosforylací (za tmy) a defosforylací (za světla) serinové složky v její molekule. Je pozoruhodné, že aktivita PEP-karboxylázy v rostlinách typu C<sub>4</sub> je regulována právě opačně - v aktivní formě se vyskytuje pouze za světla.

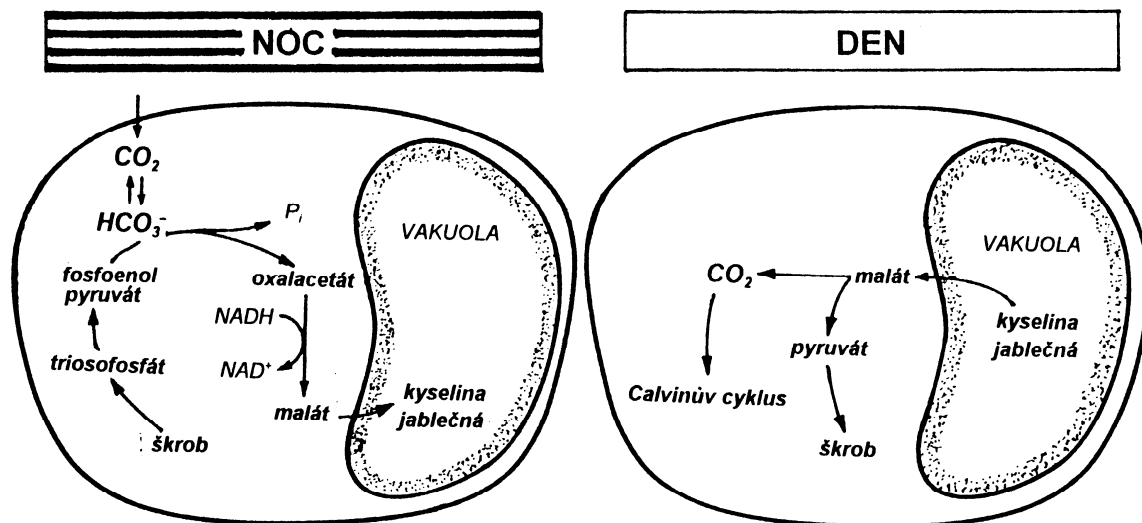


Schéma fixační cesty typu CAM.

Světlem je ovšem aktivována celá řada jiných enzymů (z toho pět jen v Calvinově cyklu!) a mechanismus aktivace je v současné době intenzivně zkoumán. U některých enzymů jde jen o redukci disulfidických skupin na sulfhydrylové na světle, někdy je to mnohem komplexnější problém, jako např. v případě enzymu *Rubisco*.

U fixační cesty CAM, obdobně jako u C<sub>4</sub>, se prakticky neuplatňuje fotorespirace. Je to opět dáno tím, že k fixaci CO<sub>2</sub> Calvinovým cyklem dochází za podmínek velmi vysoké koncentrace CO<sub>2</sub> (po uvolnění z malátu, až 5000 cm<sup>3</sup>·m<sup>-3</sup>!). Tato koncentrace zcela potlačuje oxygenázovou aktivitu *Rubisco*.

I přesto jsou však energetické náklady na fixaci jedné molekuly vyšší než u cesty C<sub>4</sub>. Kromě spotřeby 1 až 2 ATP na zpracování malátu (jako u C<sub>4</sub>-cesty), ještě navíc přistupuje potřeba 1 ATP na aktivní transport jedné molekuly malátu do vakuoly (zpětný transport je pasivní) a 0,5 ATP na jednu molekulu CO<sub>2</sub> při syntéze rezervních sacharidů (ty jsou nutné jako zdroj energie při tvorbě PEP v noci).

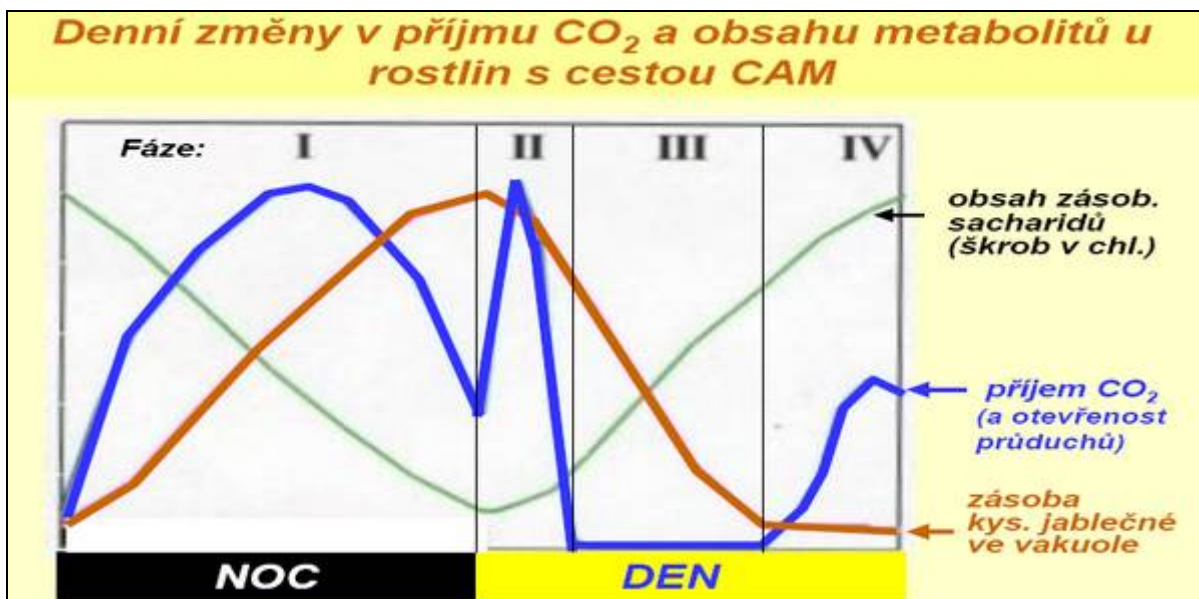
Fixační cesta CAM se vyskytuje přibližně u 15 tisíc druhů z více než 40 čeledí. Některé čeledi mají prakticky všechny druhy typu CAM (např. *Crassulaceae*, *Cactaceae*, *Mesembryanthemaceae*), avšak v mnoha jiných čeledích je sukulence a výskyt fixační cesty CAM vyhrazen jen některým zástupcům. Vazba sukulence a metabolismu CAM je pochopitelná, neboť velké vakuoly jsou potřebné ke zvýšení úložné kapacity pro malát. Tedy naprostá většina rostlin s fixační cestou CAM je více či méně sukulentní. Obráceně to však neplatí - zdaleka ne všechny rostliny se zdužnatělými orgány mají fixační cestu CAM.

Tím, že u rostlin s fixační cestou CAM jsou přítomny oba karboxylační enzymy ve stejných buňkách (není zde prostorové oddělení a dvojí druh chloroplastů jako u C<sub>4</sub>-rostlin), jsou také možné různé **odchytky od popsaného typického průběhu** opakované karboxylace CO<sub>2</sub>. U řady druhů není využíván k denní fixaci Calvinovým cyklem pouze CO<sub>2</sub> získaný dekarboxylací malátu, ale i CO<sub>2</sub> přímo přijímaný ze vzduchu (zejména po vyčerpání zásob malátu). Známe však i takové druhy, které mají sice všechny předpoklady pro CAM metabolismus, ale značnou část svého života je vůbec nevyužívají - asimilují k nerozeznání stejně jako běžné C<sub>3</sub> rostliny. Možnost přechodu z fixační cesty C<sub>3</sub> na CAM jim však umožňuje využívat fixační cestu CAM za takových podmínek, kdy je to výhodnější. To tedy znamená, že mají možnost dokonale přizpůsobovat svůj metabolismus velmi široké amplitudě kolísání faktorů vnějšího prostředí. Je poučné sledovat, za jakých podmínek aktivují tyto druhy fixační cestu CAM, neboť z toho můžeme dedukovat, jaké vnější tlaky vlastně vedly k jejímu vzniku.

Přechod na fixační cestu CAM (= *indukce CAM* u těch rostlin, které jsou toho schopny) probíhá zejména:

- za **nedostatku vody v půdě** (nejčastější případ),
- za **vysoké teploty** (např. i u našich sukulentních rostlin rodů *Sedum* a *Sempervivum*).
- **při zasolení půdy**.

Je zřejmé, že hlavní výhody fixační cesty CAM se uplatňují za nedostatku vody, kdy je nutné či výhodné omezit ztráty vody transpirací. Jedinečná schopnost CAM rostlin přijímat CO<sub>2</sub> v noci (kdy relativní vlhkost vzduchu je vysoká a tudíž ztráty vody z listů jsou minimální), umožňuje těmto rostlinám na jednotku vydané vody vytvořit asi desetkrát větší množství biomasy. Druhy s fixační cestou CAM také mohou za *krajně nepříznivých podmínek mít průduchy dlouhodobě uzavřeny a provádět vnitřní recyklaci CO<sub>2</sub> uvolněného z respiračních procesů*. To jiné rostliny nemohou. Hlavní lokality s výskytem rostlin s fixační cestou CAM leží v suchých (aridních) oblastech tropů a subtropů. V chladnějších oblastech (byť třeba taky suchých) jich nacházíme již mnohem méně. Je to dáno tím, že jen málo z nich je mrazuvzdorných - právě pro velký obsah vody ve svých buňkách.



**Taxonomické skupiny rostlin s největším zastoupením druhů s fixační cestou CAM**

**Čeleď:                      přibližný počet druhů:**

<i>Orchidaceae</i>	7000
<i>Bromeliaceae</i>	2000
<i>Cactaceae</i>	2000
<i>Aizoaceae</i>	2000
<i>Crassulaceae</i>	1200
<i>Liliaceae</i>	700
<i>Asclepiadaceae</i>	600
<i>Euphorbiaceae</i>	500
<i>Agavaceae</i>	400

**Rod:                              přibližný počet druhů:**

<i>Tillandsia</i>	1500
<i>Euphorbia</i>	500
<i>Aloe</i>	400
<i>Sedum</i>	300
<i>Agave</i>	300

## Souhrnné zhodnocení účinnosti fixace CO<sub>2</sub> na úrovni chloroplastů

Celkovou termodynamickou účinnost fotosyntetických procesů určujeme jako *poměr mezi množstvím energie vázané v nově vytvořených asimilátech, a energií fotonů, která byla při tvorbě těchto asimilátů spotřebována*. Hodnoty účinnosti fotosyntézy jsou nepochybně důležitým měřítkem rozdílů v potenciálních schopnostech rostlin vytvářet novou biomasu, avšak jejich stanovení není vůbec jednoduché. Důvodů je hned několik. Především hodnoty účinnosti jsou silně závislé na rychle proměnlivých faktorech, jako je např. množství záření, koncentrace substrátů či aktivita enzymů, a lze je tudíž určovat jen pro jisté zjednodušené podmínky. Dále je nutné se rozhodnout, co vlastně budeme považovat za vstupní energetické hodnoty - zda energii všech fotonů, které dopadají na list a chloroplasty, a nebo pouze energii fotonů absorbovaných asimilačními pigmenty.

Při teoretickém hodnocení účinnosti fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub> je užitečné posuzovat odděleně energetické přeměny v primárních a sekundárních procesech. Kolik je vlastně potřeba chemické energie na fixaci jednoho molu CO<sub>2</sub>? Víme, že k zabudování jedné molekuly CO<sub>2</sub> do asimilátů v Calvinově cyklu jsou nutné dvě molekuly NADPH a tři molekuly ATP. Energetický požadavek na tvorbu jednoho molu NADPH je přibližně 220 kJ, a na tvorbu molu ATP nanejvýš 50 kJ (přesné hodnoty jsou závislé na podmínkách, za kterých reakce probíhají). Fixace jednoho molu CO<sub>2</sub> je tudíž spojena s náklady asi 590 kJ.

Na Calvinův cyklus jsou ale obvykle napojeny ještě další reakce, které jsou v podstatě neoddelitelně spojeny s fixací CO<sub>2</sub> a které celkové náklady na fixaci zvyšují. U C<sub>3</sub>-rostlin je to fotorespirace, u rostlin s fixační cestou C<sub>4</sub> a CAM opakovaná karboxylace. Z údajů uvedených v tabulce je zřejmé, že fotorespirační ztráty u C<sub>3</sub>-rostlin zvyšují celkové náklady na fixaci CO<sub>2</sub> více, než koncentrační mechanismy u rostlin typu C<sub>4</sub> a CAM. Uvedená účinnost biochemických procesů fotosyntézy byla vypočítána jako poměr mezi energetickým ziskem (= obsahem volné energie v 1 molu vytvořené fruktózy, měřeno jejím spalným teplem, 2804 kJ mol<sup>-1</sup>) a náklady (= celková spotřeba energie na tvorbu 1 molu fruktózy příslušnou fixační cestou).

Srovnání energetických nákladů a účinnosti v sekundárních (biochemických) procesech fotosyntetické asimilace CO<sub>2</sub> u tří hlavních typů fixačních cest.

	<u>C3</u>	<u>C4</u>	<u>CAM</u>
<b>Spotřeba na fixaci 1 molekuly CO<sub>2</sub> - ATP:</b>	<b>3</b>	<b>4 - 5</b>	<b>6</b>
<b>NADPH:</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Energetické náklady na fixaci 1 molu CO<sub>2</sub> (kJ)</b>			
- bez zahrnutí fotorespirace u C3:	<b>590</b>	<b>665</b>	<b>740</b>
- se zahrnutím fotorespirace u C3:	<b>867</b>	<b>665</b>	<b>740</b>
<b>Energ. náklady na tvorbu fruktózy (kJ mol<sup>-1</sup>):</b>	<b>5202</b>	<b>3990</b>	<b>4440</b>
<b>Energetická účinnost tvorby fruktózy:</b>	<b>0,54</b>	<b>0,70</b>	<b>0,64</b>

Pro výpočet *celkové účinnosti fotosyntézy (včetně primárních procesů)* nás v první řadě zajímá, jaké jsou *maximální hodnoty* této účinnosti. Obvykle vycházíme z odhadu minimálního počtu fotonů, jejichž energie je nutná pro tvorbu patřičného množství NADPH a ATP pro sekundární procesy. Z dřívějšího výkladu již víme, že k redukci jedné molekuly CO<sub>2</sub> jsou nutné dvě molekuly NADPH a tři molekuly ATP. K redukci dvou molekul NADP<sup>+</sup> na NADPH jsou potřeba čtyři elektrony, které se uvolní ze dvou molekul vody za spotřeby



energie z osmi fotonů, neboť dva fotony (v každém fotosystému jeden) jsou nutné na transport jednoho elektronu necyklickou cestou. Tedy osm fotonů je absolutní minimum pro zabezpečení nejen 2 NADPH, ale i 3 ATP potřebných na fixaci jedné molekuly CO<sub>2</sub> (viz obrázky na str. 10). Vzhledem k uvedeným hodnotám účinnosti (tedy i ztrátovosti) biochemických procesů je ***k zabezpečení asimilace jedné molekuly CO<sub>2</sub> zapotřebí obvykle minimálně 12 fotonů***, jak bylo dokázáno i experimentálně. Pro tvorbu jednoho molu fruktózy potřebujeme tedy 6 x 12 = 72 molů fotonů. Jeden mol fotonů červeného světla (680 nm) předává při absorpci v asimilačních pigmentech energii 175 kJ, tudíž na získání jednoho molu fruktózy (2804 kJ) jsou náklady 72 x 175 = 12600 kJ. Maximální účinnost (zisk/náklady) celé fotosyntetické asimilace CO<sub>2</sub>, zahrnující primární i sekundární procesy, je tedy přibližně 2804/12600 = **0,22 (= 22%)**.

Uvedené výpočty vycházejí ze záření *absorbovaného v asimilačních pigmentech* a plně zužitkovaného pro transport elektronů. Jak uvidíme ještě v další kapitole, využití záření *dopadajícího na list* je mnohem menší, neboť přibližně 15 % fotosynteticky aktivního záření není listem vůbec absorbováno (část se odrazí, část je propuštěna), a jistý podíl absorbují i jiné součásti listu než asimilační pigmenty. Se vzrůstající hustotou toku fotonů roste také množství záření, které sice bylo absorbováno asimilačními pigmenty, ale nemohlo být využito ve fotosyntéze pro omezenou kapacitu přenosu elektronů v primárních procesech fotosyntézy.

## **Studium fotosyntetické asimilace CO<sub>2</sub> u celých listů a rostlin**

Pro své výjimečné postavení v životě rostliny je fotosyntetická asimilace CO<sub>2</sub> intenzivně studována nejen metodami biochemické a biofyzikální analýzy buněčných struktur, ale i na úrovni listů, celých rostlin či dokonce porostů. Hlavní pozornost při tomto studiu není obvykle zaměřena na detailní poznání *podstaty* asimilačních procesů, ale spíše na hledání vnitřních a vnějších faktorů omezujících ***rychlost fotosyntézy*** u asimilujících orgánů intaktních rostlin. Cílem takového výzkumu fotosyntézy je jednak poznání mechanismu, který řídí rychlost fotosyntézy u struktur s vyšší úrovní integrace, ale i konkrétní aplikace získaných poznatků, např. v zemědělské výrobě či při ekologickém studiu přirozené vegetace. V každém případě tento přístup vyžaduje používat vhodné nedestruktivní metody. Daleko nejčastěji je fotosyntéza sledována pomocí měření ***rychlosti příjmu CO<sub>2</sub>*** do listů, méně často (např. u vodních rostlin) je používáno měření rychlosti výdeje kyslíku. Odhad rychlosti fotosyntézy z měření rychlosti výměny plynů (*gazometrické metody*) je komplikován respiračními procesy v mitochondriích, které probíhají i na světle a jsou též spojeny s výměnou plynů. Pomocí gazometrie tedy nemůžeme měřit skutečnou rychlost fixace CO<sub>2</sub> v chloroplastech (která bývá označována jako ***hrubá fotosyntéza***), ale pouze rychlost ***čisté fotosyntézy***, což je rychlost hrubé fotosyntézy zmenšená o rychlost současně probíhajících respiračních procesů spojených s výdejem CO<sub>2</sub>, který se po uvolnění z mitochondrií znovu fixuje (recykluje) v chloroplastu.

## **Záření a teplota jako hlavní vnější faktory řídící rychlost fotosyntézy**

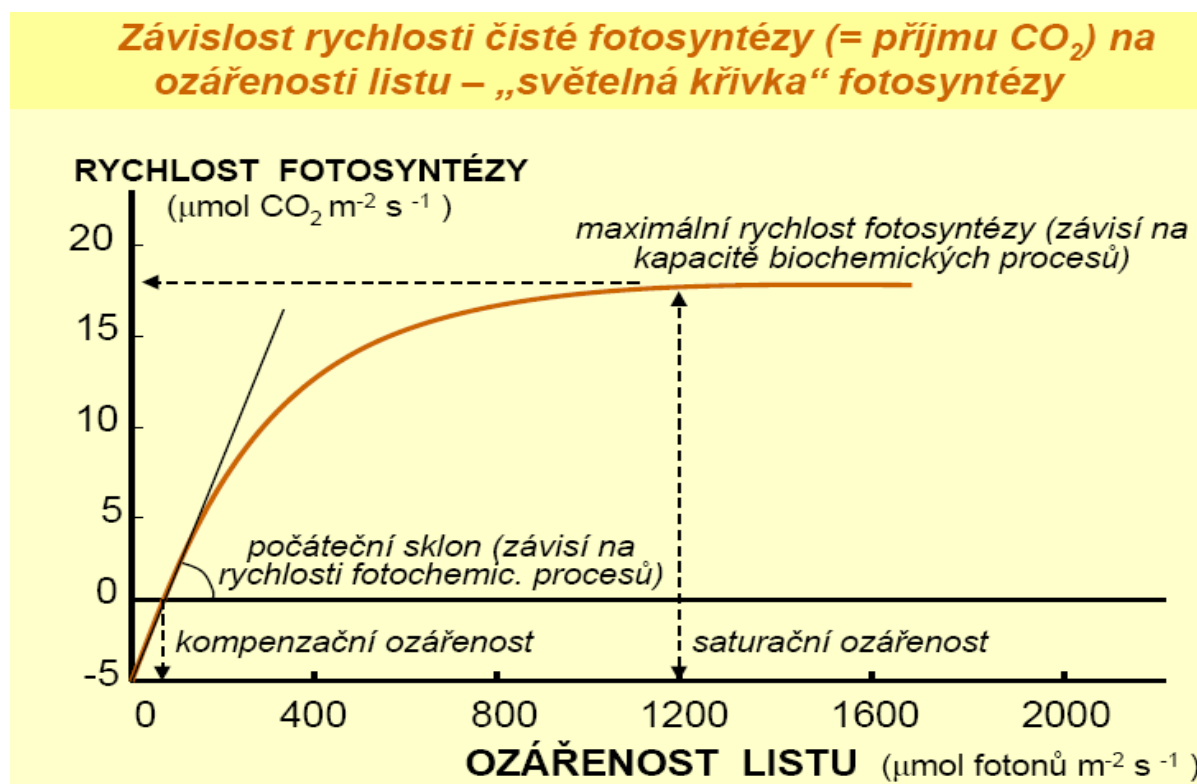
Pokud provádíme v přírodních podmínkách dlouhodobá měření rychlosti fotosyntézy a současně registrujeme i nejrůznější vnější abiotické faktory, můžeme pak stanovit jejich významnost pomocí statistických metod. Nejtěsnější korelace bývá téměř vždy zjišťována mezi fotosyntézou a zářením, na druhém místě je obvykle teplota.

Množství ***záření*** kolísá v denních i ročních cyklech a navíc v porostech se mění v závislosti na umístění listů v prostoru. Při studiu fotosyntézy nás zajímá pouze ta část spektra, která je absorbována asimilačními pigmenty, tedy přibližně v rozmezí vlnových délek 400 až 700 nm (= *fotosynteticky aktivní radiace, FAR*). Množství záření dopadající na jednotku

listové plochy za jednotku času měříme jako **ozáření** v jednotkách toku energie ( $\text{W m}^{-2}$ ), či jako **hustotu toku fotosynteticky aktivních fotonů** (zkráceně PPF, z angl. *Photosynthetic Photon Flux*,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ ). Maximální hodnoty za jasného letního dne činí asi  $500 \text{ W.m}^{-2}$ , což přibližně odpovídá  $2200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$  FAR. Rychlost čisté fotosyntézy nejčastěji měříme počtem molů  $\text{CO}_2$  přijatých jednotkou listové plochy za sekundu.

Vztah mezi rychlostí čisté fotosyntézy a ozářeností listu není lineární, nýbrž má tvar limitní křivky charakteristického tvaru. Tradičně bývá označována jako **světelná křivka fotosyntézy**. Její počátek na abscise leží u takové hodnoty ozáření, při které je rychlost hrubé fotosyntézy (= fixace  $\text{CO}_2$ ) právě dostatečná na spotřebu  $\text{CO}_2$  vydávaného z respiračních procesů (výměna  $\text{CO}_2$  s okolním vzduchem je v tom případě nulová). Označujeme ji jako **komenzační ozáření**, (dříve též světelný kompenzační bod). Hodnota kompenzační ozáření je závislá především na rychlosti respirace (a tudíž i na teplotě), a také na strukturních charakteristikách listů. Obojí však může být opět závislé na druhu rostliny a podmínkách, za kterých roste. Nejčastěji se pohybuje v rozmezí 1 až  $5 \text{ W m}^{-2}$  (= přibližně 5 až  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$  FAR).

Rychlost fotosyntézy při vzestupu ozáření nad kompenzační úroveň zpočátku stoupá téměř lineárně, později se však zpomaluje a dále již nevzrůstá - bylo dosaženo nasycení fotosyntézy zářením. Hodnotu ozáření, při které k nasycení došlo, nazýváme **saturační ozáření**. Také v hodnotách saturační ozáření jsou obrovské rozdíly dané strukturními vlastnostmi listů (tenké listy ji mají vždy nižší), i kapacitou biochemických procesů. Obecně platí, že listy s nízkou hodnotou saturační ozáření mají i nízkou rychlost fotosyntézy při nasycení zářením.



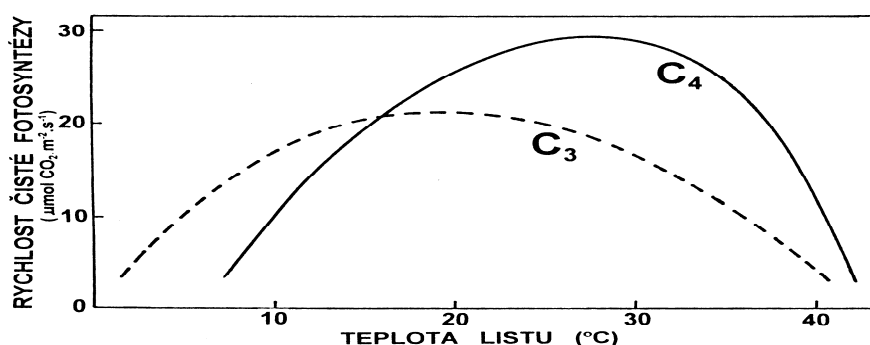
Již pouhým pohledem na světelnou křivku zjistíme, že největší přírůstek rychlosti fotosyntézy na jednotku přírůstku záření je na jejím počátku, tedy v oblasti nízkých hodnot ozáření. Uvedený poměr se nazývá **kvantový výťažek fixace  $\text{CO}_2$** :

$$Q = \frac{\text{počet molů fixovaného } \text{CO}_2}{\text{počet molů fotonů pohlcených listem}}$$

Při přesném výpočtu kvantového výtěžku vycházíme ze záření listem *pohlčeného* - je tedy nutné běžně měřené množství *dopadajícího* záření korigovat hodnotami odrazivosti a propustnosti příslušného listu. Převrácenou hodnotu kvantového výtěžku označujeme jako **kvantový požadavek**. Za nízké úrovně záření je rychlost fotosyntézy omezena především dodávkou energie (ve formě ATP a NADPH) z primárních (fotochemických) procesů. Proto hodnoty kvantového výtěžku, zjištěné ze sklonu počátečního, (lineárního) úseku světelných křivek, jsou vždy nejvyšší, se stoupající ozářeností rychle klesají

Rychlost fotosyntézy listů za vysokých hodnot ozářenosti (oblast plató světelných křivek, nasycení fotosyntézy zářením) není obvykle určována jediným faktorem - kromě nedostatečné kapacity sekundárních (biochemických) procesů může mít velký vliv i malá difuzní vodivost průduchů a také hromadění produktů fotosyntézy. Způsob, jakým určujeme významnost jednotlivých omezujících činitelů, bude popsán v další kapitole.

**Teplota** je vedle záření druhým nejvýznamnějším vnějším faktorem, který ovlivňuje rychlost fotosyntézy. Teplota kolísá v pravidelných denních i ročních cyklech. Teplotní optimum pro čistou fotosyntézu leží u většiny rostlin s fixační cestou  $C_3$  nejčastěji v rozmezí 15 až 25 °C zatímco u  $C_4$ -rostlin bývá obvykle vyšší (25 až 35 °C).



Závislost rychlosti čisté fotosyntézy listů kukuřice ( $C_4$ -rostlina) a pšenice ( $C_3$ ) na teplotě. Minimální a maximální teploty mohou být značně ovlivněny dobou působení teploty, teplotní optima jsou stálější.

Čím je vlastně určována teplotní závislost fotosyntézy? Primární (fotochemické) procesy se v běžném rozsahu teplot mění jen velmi málo. Citlivěji reagují sekundární (biochemické) procesy fotosyntézy. Jejich rychlost se s teplotou zvyšuje až po hodnotu zhruba 40 °C, kdy začíná denaturace enzymů. Křivka teplotní závislosti čisté fotosyntézy, měřené z výměny plynů, nemá ovšem tvar čisté teplotní závislosti enzymatické aktivity, neboť nutně dochází k interferenci s teplotní závislostí současně probíhající mitochondriální respirace. U  $C_3$ -rostlin navíc s teplotou vzrůstá oxygenázová aktivita *Rubisco* a tudíž i fotorespirace.

**Minimální teploty** při kterých je ještě měřitelná čistá fotosyntéza jsou u většiny druhů rostlin mírného pásma v rozmezí 0 až -3 °C, zatímco růst těchto druhů se často zastavuje již při poklesu teploty na +5 °C (v meristematické zóně). Fotosyntéza za nízkých teplot (blízkých nule) vede tedy k hromadění nevyužitých asimilátů. U mrazuvzdorných druhů (např. naše jehličnaté stromy, řada druhů trav včetně ozimých odrůd obilí) bývá čistá fotosyntéza měřitelná ještě při nižších teplotách (-5 až -7 °C). Také teplotní optimum fotosyntézy bývá u těchto druhů v zimních měsících posunuto směrem k nižším teplotám.

## Stanovení významnosti faktorů omezujících rychlost fotosyntézy

Rychlost fotosyntézy listu či celé rostliny se mění ve velmi širokém rozmezí jak v průběhu dne, tak i během vegetačního období. Není to však pouze v důsledku kolísání faktorů vnějšího prostředí, ale i v důsledku vnitřního stavu asimilačního aparátu, zejména funkčních předpokladů dílčích biochemických reakcí. Na změnách rychlosti fotosyntézy, studované na orgánové úrovni, se podílejí i morfologické a anatomické charakteristiky. Ty určují např.

maximální vodivost difuzních drah pro  $\text{CO}_2$  v listech, či počet a uspořádání chloroplastů v mezofylových buňkách. Proto při podrobnějším zkoumání příčin rozdílů v rychlosti fotosyntézy nevystačíme se systematickým měřením této rychlosti u rostlin v přírodních podmínkách a s následným statistickým vyhodnocením. Je zapotřebí provádět i pokusy v řízeném prostředí s promyšleně navozovanými změnami jednotlivých zkoumaných faktorů. Neméně důležitá je i schopnost správně interpretovat zjištěné reakce, posoudit jejich postavení v dlouhém a složitém řetězci příčin a následků.

Při kauzální analýze rozdílů v rychlosti fotosyntézy je velmi užitečné rozdělit si možné řídicí proměnné do jisté hierarchické posloupnosti. Vyjděme z ústředního postavení Calvinova cyklu u běžných rostlin s  $\text{C}_3$ -fixační cestou. Omezení rychlosti fixace může bezprostředně (primárně) způsobovat:

1) **Karboxylační aktivita enzymu Rubisco** (která závisí hlavně na jeho množství) a dále na koncentraci  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$  v chloroplastu. Za normálních okolností je koncentrace  $\text{O}_2$  vcelku stálá a omezující vliv má pouze koncentrace  $\text{CO}_2$ . Její hodnoty (i při stálém složení vnějšího vzduchu) jsou závislé na vodivosti difuzních cest v listu, především na vodivosti průduchů.

2) **Rychlost primárních (fotochemických) procesů**, která je závislá na množství záření, asimilačních pigmentů, přenašečů elektronů, atd.

3) **Hromadění produktů fixace  $\text{CO}_2$** . Malá rychlost přeměny fosforylovaných intermediátů na konečné produkty (škrob, sacharóza) vede k blokování fosfátových iontů v cytosolu a k jejich nedostatku v chloroplastech.

Pomocí gazometrických metod můžeme i u celých nepoškozených rostlin určit, který z uvedených tří procesů má v daném okamžiku největší omezující vliv. Základní postup takovéto analýzy spočívá ve stanovení závislosti rychlosti čisté fotosyntézy na záření ("světelných křivek") a na koncentraci  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$  - křivek).

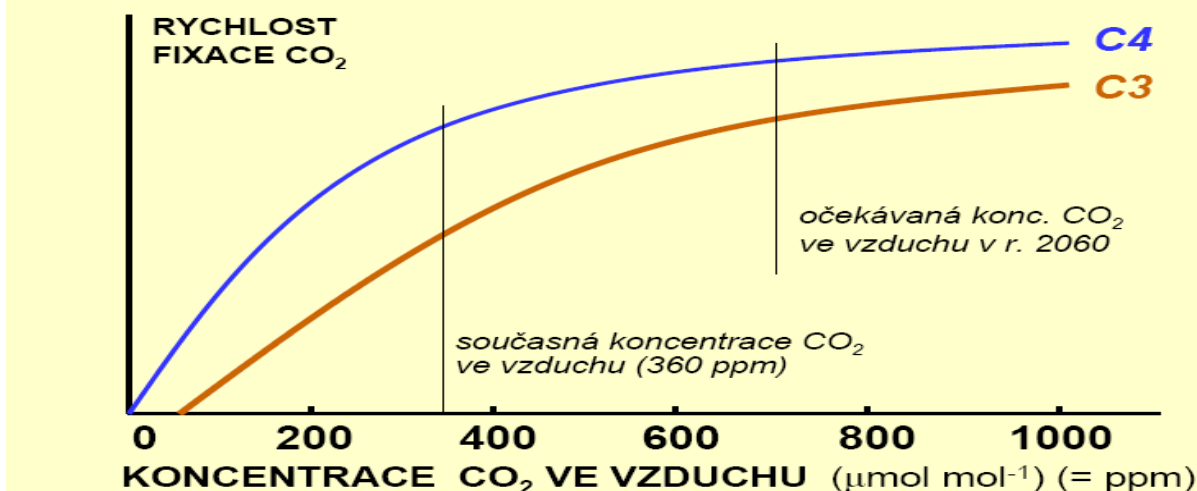
**Interpretace světelných křivek** je poměrně jednoduchá: počáteční, přibližně lineární část křivky, vymezuje interval hodnot ozáření, ve kterém asimilaci  $\text{CO}_2$  omezuje nedostatečná rychlost primárních procesů. Za saturační ozáření může být rychlost fotosyntézy určována jak nedostatečnou karboxylační aktivitou, tak i hromaděním produktů fixace. Rozlišení těchto dvou omezujících vlivů je možné po náhlém zvýšení koncentrace  $\text{CO}_2$  (či snížení  $\text{O}_2$ ) ve vzduchu - pokud se rychlost fotosyntézy nezmění, pak se jedná o limitaci asimiláty.

Poněkud náročnější je celková **analýza závislosti čisté fotosyntézy na koncentraci  $\text{CO}_2$** . Je známo, že tato závislost je u většiny rostlin (zejména s fixační cestou  $\text{C}_3$ ) téměř lineární až do hodnot, které jsou v čistém vzduchu běžné (okolo  $350 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ). **Kompenzační koncentrace  $\text{CO}_2$**  (= průsečík  $\text{CO}_2$ -křivky s abscisou) je u  $\text{C}_4$  rostlin obvykle nulová či velice blízká nule. U všech  $\text{C}_3$  rostlin je vyšší než nula, nejčastěji v rozmezí 35 až  $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ . Hlavní příčinou těchto rozdílů je fotorespirační výdej  $\text{CO}_2$  u  $\text{C}_3$  rostlin. Potlačíme-li fotorespiraci (snížením koncentrace kyslíku ve vzduchu na 2%), pak rozdíly mezi oběma skupinami rostlin zmizí.

Za dostatku záření je normální koncentrace  $\text{CO}_2$  ve vzduchu nedostatečná pro zajištění takové rychlosti jeho toku do chloroplastů, která by odpovídala kapacitě fotochemických a biochemických procesů u  $\text{C}_3$ -rostlin. Zvýšení koncentrace  $\text{CO}_2$  ve vzduchu až do hodnot asi  $1000 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$  obvykle zvyšuje rychlost čisté fotosyntézy. Limitujícím faktorem fotosyntézy není pouze vnější koncentrace  $\text{CO}_2$  ale i vodivost difuzních cest pro  $\text{CO}_2$ . Uvnitř listu (v intercelulárách a v chloroplastech) bývá při aktivní fotosyntéze koncentrace  $\text{CO}_2$  snížena přibližně o 20 až 50% ve srovnání s okolním vzduchem, což je právě dáno omezenou difuzní vodivostí listu. Navíc je tato vnitřní koncentrace silně závislá na změnách v otevřenosti průduchů, které lze často obtížně předvídat.



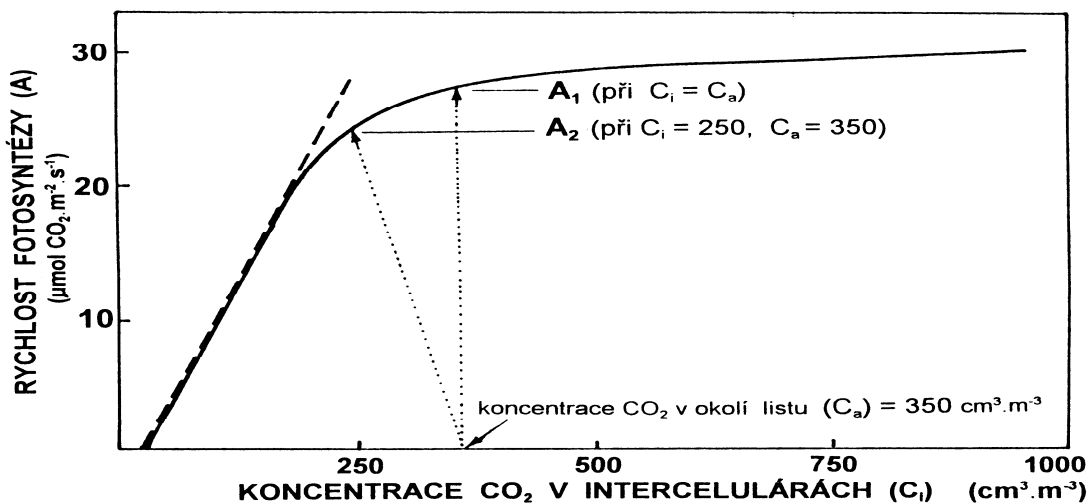
## Závislost rychlosti čisté fixace CO<sub>2</sub> na koncentraci CO<sub>2</sub>



Přesné stanovení závislosti rychlosti fotosyntézy na CO<sub>2</sub> musí proto vycházet nikoli z jeho koncentrace ve vzduchu v okolí listu, ale v *intercelulárách* (C<sub>i</sub>). Neumíme ji sice přímo měřit, ale můžeme ji vypočítat z rychlosti toku CO<sub>2</sub> do listu (= z gazometricky naměřené rychlosti čisté fotosyntézy, A), z vodivosti listu pro CO<sub>2</sub> (g<sub>CO</sub>) a z koncentrace CO<sub>2</sub> ve vnějším vzduchu (C<sub>a</sub>):

$$C_i = C_a - A/g_{CO}$$

Počáteční lineární úsek závislosti A na C<sub>i</sub> (měříme ji vždy za saturační ozáření!) vymezuje oblast, kdy je fotosyntéza limitována pouze aktivitou *Rubisco*. Z jeho sklonu lze vypočítat účinnost karboxylace. Energetické zabezpečení fotosyntézy z primárních procesů je dostatečné a také její limitace hromaděním asimilátů nepřichází v úvahu. Tyto dva procesy naopak rozhodují o maximální rychlosti fotosyntézy při saturačních hodnotách C<sub>i</sub> (= plató CO<sub>2</sub>-křivky).



Závislost světelně nasycené rychlosti čisté fotosyntézy na koncentraci CO<sub>2</sub> v intercelulárách (A/C<sub>i</sub>-křivka) a její využití při analýze limitujících faktorů fotosyntézy. Z rozdílu A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub> lze určit omezení rychlosti fotosyntézy nedostatečnou vodivostí difuzních cest pro CO<sub>2</sub>. Bližší vysvětlení je v textu.

Za normální koncentrace CO<sub>2</sub> ve vzduchu (350 cm<sup>3</sup>.m<sup>-3</sup>) a saturační ozáření se hodnoty C<sub>p</sub> pohybují nejčastěji mezi 200 až 250 cm<sup>3</sup>.m<sup>-3</sup>, což bývá právě v oblasti největšího ohybu A/C<sub>i</sub>-křivek. Rychlost fotosyntézy je v tom případě omežována jak karboxylační kapacitou (aktivitou *Rubisco*), tak rychlostí fotochemických procesů, případně i hromaděním asimilátů.

Je proto vhodné dále určovat i relativní podíl těchto faktorů na omezení rychlosti fotosyntézy, např. z reakce na snížení koncentrace  $O_2$  (zvýší se karboxylační aktivita o definovaný stupeň), nebo z reakce na náhlou a krátkodobou změnu v ozáření. Pokud dojde po této změně k oscilacím v rychlosti fotosyntézy, svědčí to o limitaci hromaděním asimilátů.

Z křivek závislosti  $A$  na  $C_i$  můžeme také určovat relativní **podíl nedostatečné vodivosti listu pro  $CO_2$**  (je dána především vodivostí průduchů) na omezení rychlosti fotosyntézy. Tento podíl zjistíme ze srovnání hodnoty  $A$  při skutečné  $C_i$  s teoretickou hodnotou  $A$  při  $C_i = C_a$  (tedy pro případ, kdy difusní tok  $CO_2$  do listu by nebyl ničím omezován).

Dosavadní studium limitujících faktorů rychlosti fotosyntézy u rostlin v přirozených podmínkách ukazuje, že jen zřídka lze označit pouze jeden faktor (či řídicí komplex) za limitující. Na řízení rychlosti fotosyntézy se obvykle podílí více mechanismů. současně a střídá se pouze jejich relativní významnost. *Regulační mechanismy směřují k optimálnímu využití všech součástí asimilačního aparátu.* Směřují tedy k takovému stavu, kdy v daném prostředí není žádná z těchto součástí ve výrazném přebytku či nedostatku.

Zvláště názorně můžeme tuto optimalizaci struktur a funkcí pozorovat u rostlin rostoucích za dlouhodobě nepříznivých podmínek. Při trvalém nedostatku záření (v zastínění) je v listech velmi malý obsah *Rubisco* i jiných enzymů, zato je udržováno velké množství asimilačních pigmentů ve světlosběrných komplexech. Počáteční sklon  $CO_2$ - křivek a plató světelných křivek má proto jen nízké hodnoty, ovšem to jsou oblasti, ve kterých tyto listy běžně neoperují. Obdobný charakter fotosyntetických závislostí mají i rostliny rostoucí za nedostatku dusíku v půdě a tím i v listech. Ve všech těchto případech přesto zjišťujeme hodnoty  $C_i$  lokalizované do oblasti ohybu  $CO_2$ -křivek, což tedy znamená limitaci rychlosti fotosyntézy více dílčími procesy současně.

Při studiu fotosyntézy na úrovni celých rostlin je v současné době věnována velká pozornost dvěma problémům, které spolu částečně souvisejí. Je to jednak **vliv trvale zvýšené koncentrace  $CO_2$**  ve vzduchu na rychlost čisté fotosyntézy, a dále ovlivňování fotosyntézy rychlostí **odběru asimilátů** z listů.

Koncentrace  $CO_2$  ve vzduchu je sice z krátkodobého hlediska poměrně stálá (denní a roční výkyvy jsou zřídka větší než  $\pm 10\%$ ), ovšem z každoročního přírůstku průměrné koncentrace lze usoudit, že ke zvýšení na dvojnásobek současného stavu by mohlo dojít už během tohoto století. Při této změně (z  $360$  na  $720 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ) navozené v *krátkodobých* laboratorních pokusech se rychlost fotosyntézy většiny běžných druhů  $C_3$ -rostlin zvyšuje přibližně o 40 až 50%. Zvýšená koncentrace  $CO_2$  stimuluje rychlost čisté fotosyntézy nejen proto, že *Rubisco* má k  $CO_2$  poměrně malou afinitu a při normální koncentraci  $CO_2$  zdaleka nemůže být v nasyceném stavu, ale i díky potlačené fotorespiraci (u  $C_3$ -rostlin).

Pokusy s *dlouhodobou* expozicí rostlin v uměle vytvořené atmosféře se zvýšenou koncentrací  $CO_2$  ( $700 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$  po několik měsíců až roků) ukazují, že za jistou dobu obvykle dochází u mnoha druhů k postupnému poklesu rychlosti fotosyntézy ve srovnání s hodnotami na počátku expozice. Tento pokles (aklimační reakce) je provázen snížením aktivity enzymů (především *Rubisco*) a hromaděním asimilátů v listech.

Snížení rychlosti fotosyntézy v důsledku **hromadění asimilátů** (způsobené jejich nedostatečným využíváním) není pouze problémem u rostlin pěstovaných za zvýšené koncentrace  $CO_2$ , které mají velmi zrychlenou fotosyntézu. Je velmi závažný i za normální koncentrace  $CO_2$  ve vzduchu, a sice za takových podmínek, kdy rostliny mají malou kapacitu pro ukládání asimilátů ve formě zásobních látek a současně je nemohou ani využívat ke zrychlení růstu, ať už z důvodů morfogenetických, či v důsledku inhibice růstu vnějšími faktory (vodní stres, nízká teplota, atd.).

Současný výzkum vztahů mezi využíváním asimilátů a fotosyntézou se zaměřuje na řešení několika otázek současně. Především jde o vysvětlení **mechanismu inhibice fotosyntézy**, což předpokládá porozumět biochemické regulaci složitého metabolismu cukrů

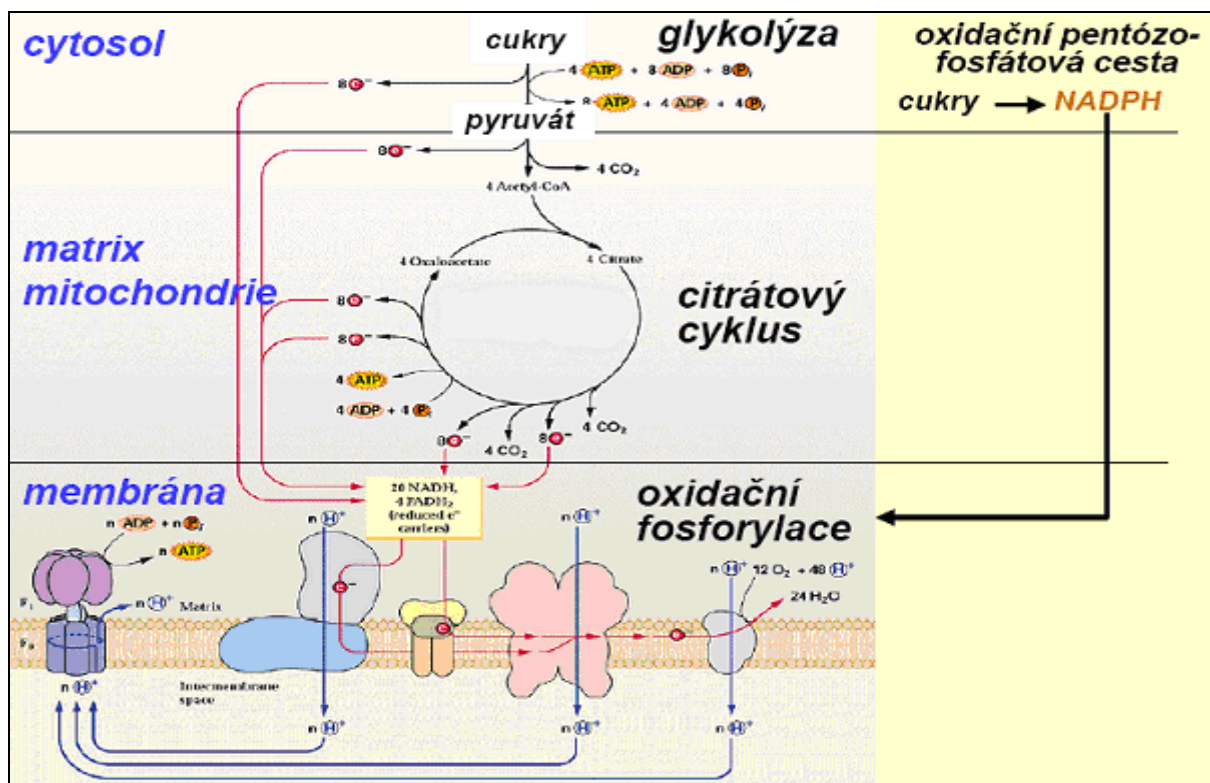
v buňkách (mimo chloroplasty), a najít příčiny, které vedou ke zpomalení tvorby sacharózy (jako hlavního cukru transportovaného do jiných orgánů), či k hromadění fosforylovaných cukrů, a tím i k nedostatku fosfátových iontů v chloroplastech. U řady druhů však nelze negativní vztah mezi rychlostí fotosyntézy a koncentrací jakékoliv cukerné sloučeniny vůbec dokázat, i když při zvýšeném odběru asimilátů jinými orgány dochází i u těchto rostlin k výraznému zrychlení fotosyntézy.

Velké úsilí je též v současné době soustředěno na poznání mechanismu, který řídí **zvětšování úložné kapacity** pro asimiláty (růst zásobních orgánů, nových odnoží či tvorba semen a plodů) v závislosti na zrychlení fotosyntézy. To jsou však již problémy, které mohou být řešeny pouze ve spolupráci jak s biochemií, tak i s růstovou fyziologií (fytohormonální regulace) a s molekulární biologii rostlin.

## Respirační procesy

Téměř polovina všech sacharidů vytvořených fotosyntetickou asimilací oxidu uhličitého je v průběhu dne opět rozložena v souběžně probíhajících biochemických reakcích, které se souhrnně označují jako *respirace*. Tento rozklad bývá spojen s příjmem kyslíku a jeho konečným produktem je oxid uhličitý a voda. Zdaleka ne všechny molekuly rozkládaného substrátu jsou však oxidovány až na  $\text{CO}_2$ . Smyslem respirace není totiž pouze zpřístupnění energie získané rozkladem složitějších organických sloučenin pro jiné procesy, ale i získání jednodušších organických molekul, které jsou pak využity jako základní stavební moduly v navazujících syntetických procesech. Obdobně jako u fotosyntézy, celý komplex respiračních procesů můžeme rozdělit do několika na sebe navazujících skupin:

- *rozklad primárního substrátu* na jednodušší části (glykolýzou a oxidačním pentózovým cyklem, převážně v cytosolu),
- *citrátový cyklus* v matrix mitochondrií,
- *elektronový transport a oxidační fosforylace* na membránách mitochondrií.



## Rozklad primárního substrátu v cytosolu

V každé rostlinné buňce je pohotovostní zásoba rychle využitelného substrátu, tvořeného především sacharózou a fosforylovanými hexózy (glukóza-1-fosfát, glukóza-6-fosfát, fruktóza-6-fosfát). Tato zásoba se neustále doplňuje, a to jednak z nových asimilátů (transportem trióza-fosfátů, především glycerinaldehyd-3-fosfátu z chloroplastů), jednak rozkladem složitějších sacharidů, zejména sacharózy, škrobu a fruktanů, ale v jistých případech i lipidů a proteinů.

Klasické schema **glykolýzy** začíná od molekuly hexózy, ze které po devíti krocích a za účasti deseti různých enzymů vznikají dvě molekuly pyruvátu. Molekula hexózy se nejprve dvakrát fosforyluje a pak rozpadá na dvě fosforylované triózy. Klíčové postavení pro další reakce má **glycerinaldehyd-3-fosfát**, který slouží jako donor elektronů (a protonu) pro redukci pyridinového nukleotidu ( $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}$ ). Při dalších přeměnách se tvoří **pyruvát** jako konečný produkt glykolýzy, a uvolněná fosfátová skupina přechází na ADP za vzniku ATP. U rostlin, na rozdíl od živočišných buněk, může být produktem glykolýzy kromě pyruvátu i **malát**. Ten vzniká také z fosfoenolpyruvátu podobně jako pyruvát, ovšem vedlejší metabolickou cestou přes oxalacetát. Tvorbu oxalacetátu katalyzuje PEP-karboxyláza.

**Energetický zisk glykolýzy** je velmi malý - z jedné molekuly hexózy lze získat nanejvýš 2 ATP a 2 NADH, což představuje jen zlomek z celkové využitelné energie vstupního substrátu. Hlavní funkcí glykolýzy je tedy příprava jednodušších sloučenin (především pyruvátu a malátu, ale i jiných meziproductů) pro další rozkladné i syntetické procesy.

Pokud mají buňky dostatek kyslíku, většina produktů glykolýzy je dále oxidována v mitochondriích. Za nedostatku kyslíku glykolýza sice probíhá, avšak hromadí se produkty musí být zpracovány jinými cestami, souhrnně označovanými jako **fermentace** (kvašení). Akceptorem elektronů jsou v tom případě různé organické látky a konečným produktem nejčastěji kyselina mléčná nebo etanol. Při těchto reakcích dochází současně k regeneraci  $\text{NAD}^+$ , takže je zajištěn nerušený průběh glykolýzy. Při náhlém nedostatku kyslíku dochází obvykle nejprve ke tvorbě laktátu, ale později převažuje tvorba etanolu, který je relativně méně toxický (nepůsobí silné okyselení cytosolu).

Reakce probíhající při glykolýze jsou reverzibilní a skutečně také můžeme někdy v rostlinách pozorovat syntézu sacharidů z pyruvátu, malátu či z jiných jednoduchých organických sloučenin vzniklých rozpadem větších necukerných molekul. Tento proces označovaný jako **glukoneogeneze** je hojně využíván při mobilizaci rezerv uložených ve formě tuků (např. při klíčení olejnatých semen).

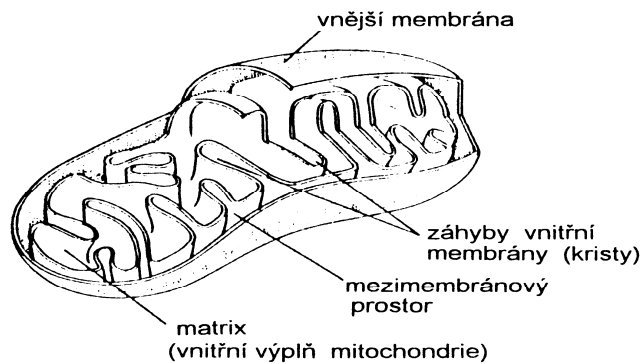
Paralelně s glykolýzou obvykle probíhá ještě jedna varianta rozkladu primárního substrátu označovaná jako **oxidační pentózový cyklus**. Na rozdíl od glykolýzy umožňuje úplnou oxidaci hexóz až na  $\text{CO}_2$ , aniž by musely být využívány mitochondriální procesy. V první fázi tohoto cyklu dochází k oxidaci jednoho uhlíku v hexóze až na  $\text{CO}_2$  za vzniku pentózy a dvou NADPH. Postupně se hromadí pentózové molekuly mohou být využity k tvorbě hexóz (regenerační fáze cyklu), nebo pro jiné syntézy.

Pentózový cyklus je hlavním zdrojem NADPH v cytosolu. Velký význam mají i některé meziproducty, např. ribóza-5-fosfát jako prekurzor pro tvorbu nukleotidů, erythróza-4-fosfát pro tvorbu fenolických sloučenin včetně ligninu. Asi 20 až 30 % sacharidů se rozkládá právě tímto cyklem. Je tedy pro rostliny nepostradatelný a jeho aktivita se snižuje pouze za anaerobních podmínek. Pentózový cyklus ovšem nemůže být nikdy hlavní respirační cestou, protože se v něm nevytváří ATP, který je pro většinu buněčných procesů nejpohotovějším a nenahraditelným zdrojem energie. Pentózový cyklus probíhá nejen v cytosolu, ale i v chloroplastech, ovšem tam pouze za tmy. Inhibice světlem je nutná, aby se vyloučil jeho nepříznivý vliv na průběh Calvinova cyklu.

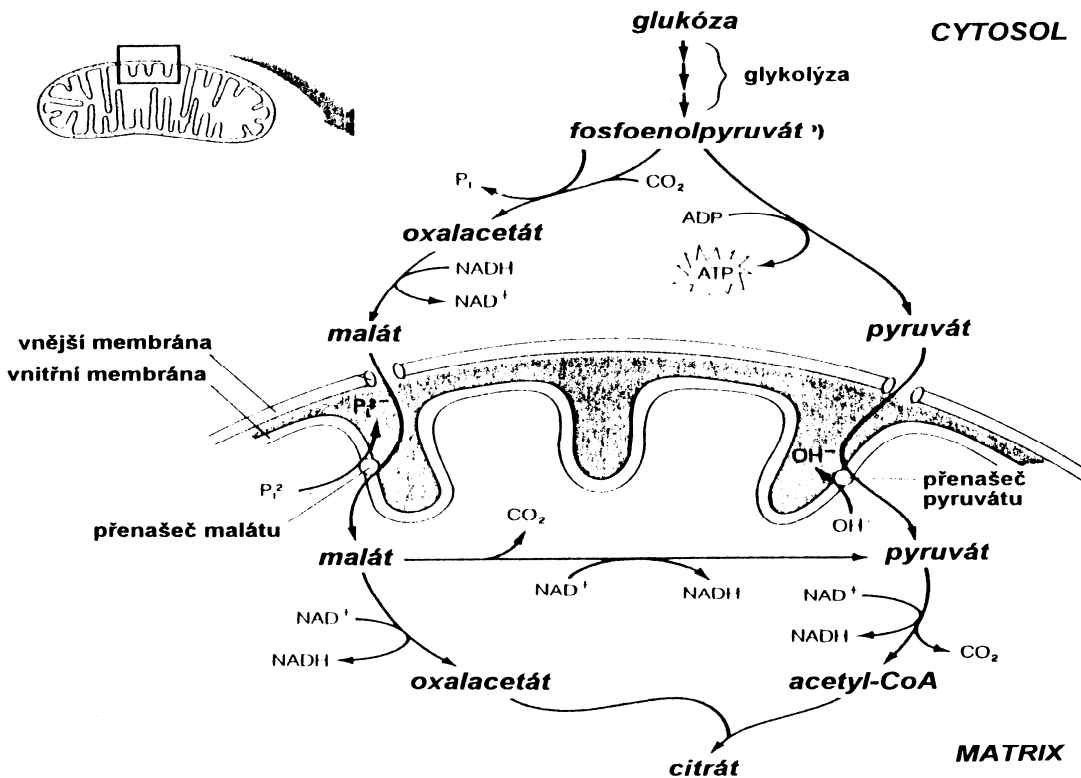


## Oxidační procesy v mitochondriích

Oxidace pyruvátu, malátu a NADH, vytvořených v glykolýze, probíhá v mitochondriích. Tam je teprve dosaženo největšího energetického výtěžku. Mitochondrie jsou obdobně jako chloroplasty semiautonomní orgány s dvojitou membránou, s vlastními ribozómy, DNA a RNA. Vnější membrána je poměrně dobře propustná i pro velké molekuly (přibližně do 10 kDa), tedy pro většinu buněčných metabolitů a iontů. Vnitřní membrána vytváří výrazné záhyby, označované jako *kristy*. V této membráně jsou hojné jednak **transportní bílkoviny**, (zvláště pak přenašeče pro pyruvát, malát,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , ATP a ADP), ale i **proteinové komplexy** na kterých probíhá oxidace NADH, transport uvolněných elektronů až na kyslík a tvorba ATP. Střední uzavřený prostor vyplňuje **základní hmota** (*matrix*) mitochondrie, ve které probíhá velké množství biochemických reakcí. Proto je mimořádně bohatá na enzymy a zpracovávané metabolity.



Obvyklá stavba rostlinné mitochondrie

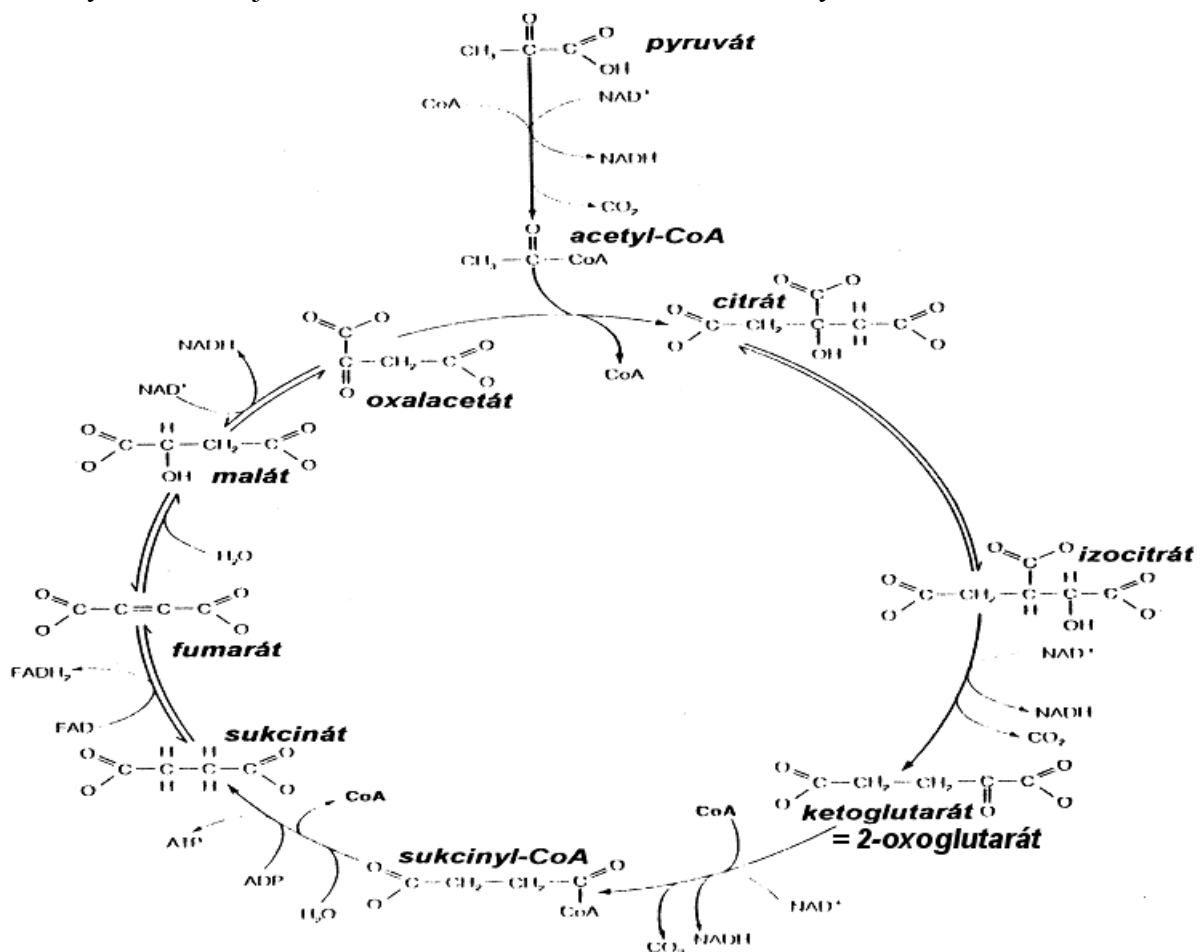


Do rostlinné mitochondrie může vstupovat (přes specifické přenašeče) nejen pyruvát, ale i malát. Obrázek zachycuje obě tyto možnosti, které však nemusí být využívány současně či stejně často.

Pyruvát transportovaný z cytosolu je v matrix mitochondrie nejprve dekarboxylován - uvolňuje se jedna molekula CO<sub>2</sub> a acetátový zbytek je vnášen pomocí koenzymu *A* do vlastního **citrátového cyklu** (někdy bývá též nazýván jako **cyklus trikarboxylových kyselin** či **Krebsův cyklus** (podle svého objevitele H.A.Krebse). V něm se navazuje na oxalacetát za vzniku šestiuhlíkaté kyseliny citronové, která v dalších sedmi krocích postupně ztrácí dva uhlíky (ve formě dvou molekul CO<sub>2</sub>).

Postupnou oxidací jedné molekuly pyruvátu v citrátovém cyklu vznikne kromě 3 molekul CO<sub>2</sub> i jedna molekula ATP, ale hlavně 3 NADH a 1 FADH<sub>2</sub>, ve kterých je uchováno ještě velké množství volné chemické energie. Ta se využívá na tvorbu ATP v navazujících membránových procesech. Ne vždy ovšem musí být veškerý malát nebo pyruvát oxidován v celé soustavě reakcí. Citrátový cyklus je pro buňku významným centrem jak katabolických, tak i anabolických reakcí, zdrojem řady meziproductů pro nejrůznější syntézy, zejména aminokyselin.

Citrátový cyklus v rostlinných mitochondriích má některé zvláštnosti, které nenalzáme u živočišných. Je to např. přítomnost jablečného enzymu, který umožňuje rozklad malátu na pyruvát, a tak zachovat funkčnost cyklu i při velkém odběru 2-oxoglutarátu na asimilaci amonných iontů. A je to také tvorba ATP místo u živočichů obvyklého GTP.



Zjednodušené schéma citrátového cyklu (nejsou uvedeny enzymy nutné pro naznačené reakce).

Konečný přenos elektronů z redukováných sloučenin, vzniklých v citrátovém cyklu a při glykolýze, probíhá pomocí složité soustavy oxidoreduktáz, označované jako **respirační řetězec**. Redoxní systémy, které tvoří tento řetězec, jsou umístěny na několika funkčně propojených **multiproteinových komplexech** ve vnitřní membráně mitochondrie.

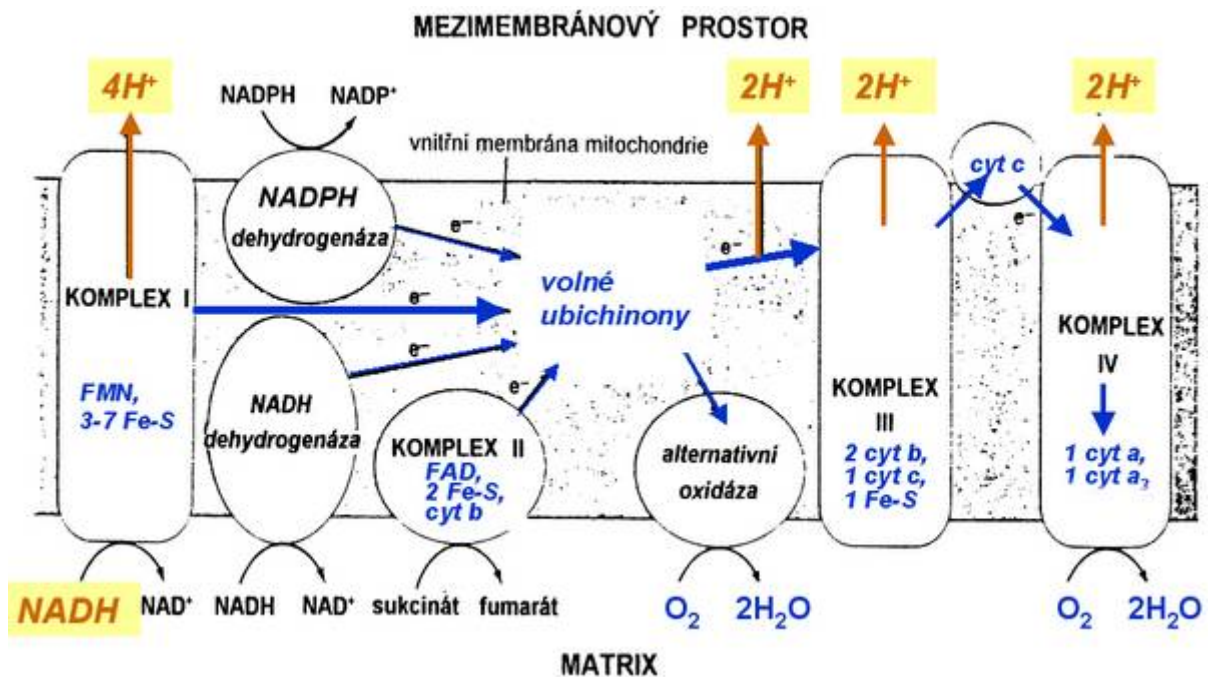
**Komplex I (NADH dehydrogenáza)** slouží k redukcí NADH (produkovaných citrátovým cyklem) a přenos uvolněných elektronů pomocí několika pevně vázaných redoxních systémů (flavinmononukleotid - FMN, a další tři (někdy i více) redoxní centra typu Fe-S proteinů). Elektrony jsou pak přenášeny na **ubichinon**, který je chemicky i funkčně podobný plastochinonům v chloroplastech. Molekuly ubichinonu (a jeho redukované formy ubichinolu či hydrochinonu) jsou volně pohyblivé v mitochondriální membráně a proto jsou důležitým prostředníkem pro několik navazujících reakcí.

**Komplex II (sukcinátdehydrogenáza)** zajišťuje přenos elektronů ze sukcinátu (ten je součástí citrátového cyklu!) na ubichinon pomocí redoxního systému FAD - FADH<sub>2</sub> (flavinadeninukleotid). Součástí komplexu II jsou též asi dva FeS-proteiny a cytochrom typu *b*. V tomto komplexu nedochází k membránovému přenosu protonů.

**Komplex III (cytochrom BC<sub>1</sub> komplex)**, obsahuje dva cytochromy *b*, cytochrom *c*<sub>1</sub> a FeS-protein. Tyto redoxní systémy zprostředkovávají přenos elektronů z ubichinolu na další mobilní přenašeč, cytochrom *c*.

**Komplex IV (cytochromoxidáza)**, obsahuje dva cytochromy typu *a*, které jsou schopny díky specificky vázaným iontům mědi (kromě železa v hemové skupině), přenosu elektronů na konečný akceptor - **kyslík**.

Kromě uvedených základních komplexů byly zjištěny v rostlinných mitochondriích ještě některé další pomocné systémy, umožňující v jistých úsecích hlavního řetězce souběžný transport elektronů. Především jde o **dva komplexy dehydrogenáz**, které mají obdobnou funkci jako komplex I. Jeden z nich je umístěn na vnější straně membrány, kde usnadňuje oxidaci NADPH (a také NADH) přicházejících z cytosolu. Další komplex NADH-dehydrogenázy je připojen k vnitřní straně membrány a funguje zcela obdobně jako komplex I (liší se však citlivostí k některým inhibitorům).



Hlavní proteinové komplexy ve vnitřní membráně mitochondrie a jejich součinnost při přenosu elektronů

Redoxní výměny při oxidaci NADH na komplexu I a přenos elektronů nejběžnější cestou (přes ubichinony, a komplexy III a IV až na kyslík) jsou spojeny s přenosem vodíkových iontů z matrix do mezimembránového prostoru, jak je znázorněno na obrázku. Při jejich transportu zpět, hnaném vytvořeným elektrochemickým gradientem přes hojně ATP-syntázy (stejněho typu a stejně účinné jako v chloroplastech) dochází k tvorbě ATP (= **oxidační fosforylace**).

Molekuly ATP, které se hromadí v matrix, je nutno neustále transportovat do cytosolu, a naopak do mitochondrií přivádět ADP a fosfátové ionty. Pro tento transport slouží hojně antiportové přenašeče ve vnitřní membráně.

Pozoruhodnou zvláštností dýchacího řetězce *rostlinných* mitochondrií je existence *alternativní cesty*, která umožňuje přenos elektronů z ubichinolu na kyslík i bez účasti cytochromových komplexů. Funguje tedy i po jejich zablokování kyanidem - proto bývá též označována jako *kyanid-rezistentní cesta*. Transport elektronů z ubichinolu na kyslík přes komplex "alternativní oxidázy" na vnitřní straně mitochondriální membrány není spojen s přenosem vodíkových iontů a proto ani potenciální energetický rozdíl přenosu nelze využít pro tvorbu ATP (dochází pouze k přeměně na tepelnou energii).

Význam alternativní cesty pro rostliny je stále ještě předmětem výzkumu. Byla dokázána u všech dosud zkoumaných druhů a také víme, že probíhá souběžně s cytochromovou cestou, i když s velmi proměnlivou rychlostí. Její podíl na celkovém toku elektronů vždy nápadně stoupá při velkém nadbytku respiračního substrátu (např. za vysoké rychlosti fotosyntézy v listech). Je proto možné, že jde o způsob jak zajistit rychlý rozklad substrátu (rychlejším odvodem elektronů) a přitom si zachovat pod kontrolou optimální množství vytvářeného ATP. Větší význam však alternativní cesta asi má jako regulační mechanismus pro udržování optimálního poměru mezi množstvím ATP, NADH a některými intermediárními produkty citrátového cyklu (např. 2-oxoglutarátu, spotřebovávaného při asimilaci amonných iontů).

## Vnitřní a vnější faktory řídící rychlost respirace

Regulace rychlosti respiračních procesů je neobyčejně složitý problém. Je to dáno především tím, že jde o komplex velmi různorodých biochemických reakcí, které mohou být nezávisle na sobě stimulovány či inhibovány specifickými metabolity. Ne vždy musí regulace směřovat k zajištění maximálně efektivních energetických přeměn. Přesto již známe některé mechanismy a uzlové body v celém komplexu reakcí, kterými rostlina může zvláště účinně řídit rychlost respirace.

Nepochybně nejdůležitější vnitřní regulace směřují k přizpůsobení rychlosti respirace energetickým potřebám rostliny. Nejjednodušší a vcelku samovolně působící regulační mechanismus je ovládán *koncentrací adenylátů*, především množstvím volného ADP, které pochopitelně vzrůstá při větší spotřebě energie (rychlejším štěpením ATP). Koncentrací adenylátů je jednak řízena rychlost glykolýzy (změnou aktivity enzymů fosfofruktokinázy a pyruvátkinázy), a také rychlost oxidační fosforylace v mitochondriích.

Rychlost respirace je dále závislá na *množství primárního substrátu* v buňkách. Zvýšené množství hexos (a také fosfátových iontů) v cytosolu zrychluje glykolýzu i ostatní respirační procesy. Rychlost hydrolyzy zásobních sacharidů je zcela nezávislá na aktivitě respiračních enzymů - je řízena samostatně, stejně tak jako rychlost transportu nově vytvářených asimilátů. Také oxidační pentózová cesta není zřejmě řízena "poptávkou" po energii, neboť její hlavní význam je spíše ve tvorbě intermediátů.

V mitochondriálním úseku respiračních procesů může rostlina řídit jejich rychlost pomocí *signálů do transportních proteinů* ve vnitřní membráně. Tím ovlivní například rychlost výměny ATP a ADP, která má pro průběh respirace zásadní význam. Kromě *vnitřních* regulací, které mohou měnit rychlost respirace rostliny i ve zcela neměnném vnějším prostředí, působení *vnějších abiotických činitelů* má často nadřazenou regulační úlohu.

**Teplota** má zvláště výrazný vliv, neboť na ní závisí rychlost všech enzymatických reakcí. Při zvýšení teploty o 10°C se rychlost respirace obvykle zdvojnásobí (faktor  $Q_{10} = 2$ ). To platí v teplotním rozmezí přibližně od 0°C do 30°C, pak se již rychlost respirace zpomaluje. Při teplotách okolo 40°C začne velmi rychle klesat. Zpomalení při vyšší teplotě může souviset s nedostatečně rychlou difuzí kyslíku (difuze se také zrychluje s teplotou, ale mnohem méně,  $Q_{10} = 1,1$ ). Hlavní příčinou zpomalení a posléze poklesu respirace je však



obvykle denaturace některých enzymů. Nepříznivý vliv vyšší teploty se zejména projevuje při jejím delším působení. Charakter teplotní závislosti respirace může být značně odlišný u různých druhů rostliny a bývá ovlivněn i podmínkami, ve kterých rostou. Rozdíly jsou zejména v hodnotách *minimální teploty*, kdy je vůbec respirace ještě měřitelná (u některých arktických druhů i při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  !), a v hodnotách maxima, ale také *rychlost vzestupu* respirace za běžných teplot nemusí být zcela stejná. Rozdíly v  $Q_{10}$  mohou být v rozmezí od 1,8 do 2,4.

**Záření** nemá na rychlost respirace přímý vliv, ale ovlivňuje ji nepřímo přes fotosyntézu. V cytosolu fotosyntézy schopných buněk osvětlených listů se fotofosforylací zvyšuje koncentrace ATP a současně se snižuje množství ADP, což může mít inhibiční vliv na rychlost respirace. Současně se však zvyšuje množství volných cukrů, a tak na začátku temné periody je rychlost respirace zvýšena.

**Koncentrace kyslíku** je obvykle v mitochondriích dostatečná, neboť jeho transport do buněk je velmi rychlý. V případě nedostatečného zásobení kyslíkem (*hypoxie*, například u kořenů rostlin rostoucích v zaplavených či v udusaných půdách) dochází v buňkách k celé řadě metabolických změn. Především je velmi omezena tvorba ATP v mitochondriích, neboť je zpomalen transport elektronů (pro nedostatek jejich konečného akceptoru  $\text{O}_2$ ). Dále je v cytosolu stimulována fermentace a její produkty (především kyselina mléčná a etanol) jsou ve větší koncentraci toxické. Velmi často bývá za nedostatku kyslíku pozorováno zvýšení rychlosti glykolýzy, které ovšem vede k neefektivnímu vyčerpání zásobních látek.

## Význam respirace pro další fyziologické procesy v rostlinách

Respirační procesy se sice tradičně v učebnicích fyziologie rostlin probírají jako součást uhlíkového metabolismu, ovšem je nutné si stále uvědomovat jejich podvojný charakter - slouží jak k transformaci uhlíkatých sloučenin, tak i k přenosu obrovského množství chemicky vázané energie. Respirace probíhá, na rozdíl od fotosyntézy, ve všech živých buňkách rostliny a je proto spojena téměř se všemi ostatními fyziologickými procesy. I přes tuto složitost lze rozdělit návaznosti respirace na jiné procesy do tří hlavních skupin:

- *podpora růstových procesů* (energie a materiál pro tvorby nových struktur),
- *podpora procesů údržby* již vytvořených struktur, zejména obměna proteinů, udržování potenciálového gradientu na membránách,
- *podpora procesů spojených s příjmem živin a s transportem látek* v rostlině.

**Zabezpečení růstu** (růst je zde míněn jako syntéza a hromadění nové biomasy), a to energií i jednoduchými organickými sloučeninami, je prvořadou úlohou respirace v rostlinách. Je proto pochopitelné, že existuje přímá závislost mezi rychlostí růstu a rychlostí respirace. Vyšší rostliny však nerostou rovnoměrně ve všech svých částech a vztah mezi rychlostí růstu a respirace je vázán vždy jen na příslušnou část rostliny.

Biochemické procesy spojené s tvorbou stavebních složek nově vytvářené biomasy jsou vcelku dobře známé. Pokud stanovíme chemické složení této nové biomasy, můžeme vypočítat materiálové a energetické náklady na její tvorbu. Velmi užitečný je též **koeficient energetické účinnosti syntetických procesů (Y)**:

$$Y = \frac{\text{energie v nově vytvořené sloučenině}}{\text{energie ve spotřebovaných substrátech}}$$

Množství jednotlivých složek biomasy rostlin, které se vytvoří heterotrofními procesy z *jednoho gramu glukózy*, a koeficient účinnosti jejich syntézy (Y).

Složka	Vytvořené množství (g)	Y
oligo + polysacharidy	0,85	0,93
proteiny	0,67	0,78
lipidy	0,36	0,88
lignin	0,48	0,80

Jestliže známe chemické složení nově vznikající biomasy, můžeme z uvedených dílčích nákladů a účinnosti vypočítat celkovou účinnost. Například v sušině nových listů bývá průměrně 70% sacharidů, 15% proteinů, 5% lipidů, 5% ligninu. Celková účinnost syntetických procesů by pak měla být asi 0,85. *To je ovšem hodnota teoretického maxima účinnosti, které prakticky nelze dosáhnout.* Biochemické syntézy z řady důvodů neprobíhají jen po energeticky nejvýhodnějších cestách, a kromě toho vyžadují některé další nepřímé náklady (např. na transport výchozích substrátů a konečných produktů). *Skutečná účinnost se proto pohybuje nejčastěji v rozmezí od 0,50 do 0,75.*

V každé buňce, a to i u nerostoucích orgánů, probíhají energeticky náročné **udržovací procesy**, jejichž rychlost musíme vzít také v úvahu. Respirace spojená s údržbou buněčných struktur a funkcí bývá někdy vyčleňována do zvláštní kategorie ("*udržovací respirace*"). Nejde samozřejmě o jiný typ biochemických procesů, ale pouze o jistou část z celkové respirační aktivity, která souvisí s údržbou. Stanovit velikost této složky respirace je metodicky velmi obtížné, přesto se však intenzivně hledají vhodné postupy (například stanovením respirace u nerostoucích orgánů či měřením respirace těchže rostlin za různé rychlosti růstu s následnou extrapolací zjištěné závislosti pro nulovou rychlost růstu). Zdá se totiž, že právě ve velikosti udržovací složky respirace mohou být značné rozdíly mezi druhy a odrůdami, což může významně určovat jejich potenciální produkční schopnosti. Možnost využít rozdílů v "udržovací respiraci" jako kritéria při šlechtění se proto jeví jako velmi perspektivní. Průměrné denní ztráty biomasy způsobené udržovací složkou respirace bývají nejčastěji okolo dvou procent z celkové hmotnosti rostliny.

Ještě obtížnější než stanovení velikosti celkové udržovací respirace je odhad nákladů na údržbu jednotlivých struktur a funkcí v rostlině. K nejvíce energeticky náročným procesům patří **obměna proteinů**. Průměrná životnost molekul proteinů zapojených do metabolických procesů se odhaduje přibližně na 10 dní. Náklady na jejich obměnu se odhadují zhruba na 10 mg glukózy na gram suché hmotnosti rostliny za den. Obdobné množství substrátu se zřejmě spotřebuje při udržování potenciálových gradientů na membránách (aktivním transportem iontů) a při transportu v lýku. Je pochopitelné, že náklady na obměnu proteinů v jednotce biomasy rostliny jsou tím vyšší, čím větší je jejich obsah a čím kratší je jejich životnost.

Velmi obtížně se také stanovuje množství respirací uvolněné energie nutné na **příjem nezbytných iontů solí** (minerálních živin) kořeny. Tyto potíže vyplývají z rozmanitosti mechanismů příjmu solí - vždyť i tentýž iont může být někdy přijímán pasivně a jindy aktivně. Hojně přijímaný nitrátový iont může být někdy téměř současně s příjmem v kořenech redukován (energeticky velmi náročně!), jindy probíhá redukce až v listech, kde může být využita energie z primárních procesů fotosyntézy. Nejnovější výsledky ukazují, že náklady na příjem a prvotní asimilaci minerálních živin budou vyšší, než se dosud odhadovalo. U rychle rostoucích druhů mohou vyžadovat asi 10 % veškeré energie uvolněné respiračními procesy v celé rostlině, u pomalu rostoucích druhů (zvláště pak za nedostatku živin v půdě) to může být i více než 20 %.

## Účinnost a metody měření respiračních procesů

K rozkladným respiračním procesům mohou být využívány různé druhy substrátů a také ne vždy je rozklad úplný, tedy až na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Přesto je však užitečné vědět, jaké maximální množství energie se může při respiraci uvolnit.

Při úplné oxidaci jedné molekuly glukózy může vzniknout celkem až 32 molekul ATP (2 v glykolýze a zbývajících 30 pak z mitochondriálních procesů):

GLYKOLÝZA	CITRÁTOVÝ CYKLUS	MEMBRÁNOVÉ PROCESY	CELKEM
2 ATP			2
2 NADH		5 ATP	5
	2 ATP		2
	8 NADH	20 ATP	20
	2 FADH <sub>2</sub>	3 ATP	3

**Maximální účinnost** (efektivitu) respirace zjistíme z podílu mezi získanou energií (standardní volná energie 32 molekul ATP je přibližně 1,6 MJ) a volnou energií rozkládaného substrátu (jedné molekuly glukózy, asi 2,8 MJ), což je tedy zhruba 0,57. Zbývajících 43% chemické energie obsažené v glukóze se z rostliny ztrácí přeměnou na teplo.

V reálných podmínkách však tak vysoké účinnosti energetické přeměny glukózy sotva lze dosáhnout. Zejména proto, že v rostlinné buňce probíhají současně i méně energeticky účinné respirační cesty, které výslednou účinnost nutně snižují. Jednak je to malátová varianta glykolýzy, která je u rostlin mnohem častější než pyruvátová. Dále přistupuje velmi málo účinná alternativní cesta přenosu elektronů v mitochondriích.

V cytosolu mohou ještě navíc probíhat v jisté míře další oxidační procesy, o jejichž existenci se můžeme poměrně snadno přesvědčit. Po zablokování cytochromové cesty (kyanidem) i alternativní cesty (kyselinou salicylhydroxamovou, SHAM) je stále ještě jistá respirační aktivita měřitelná. Původně byla souhrnně označována jako *reziduální respirace*, o jejíž biochemické podstatě a lokalizaci se dosud mnoho nevědělo. Bylo však známo, že probíhá pouze mimo mitochondrie a není spojena s tvorbou ATP. Nyní již víme, že se jedná převážně o takzvané *peroxidázové dýchání*. Nejde však o nějakou samostatnou respirační cestu, ale pouze o oxidaci NADH (1 O<sub>2</sub> / 2 NADH) katalyzovanou peroxidázami. Může mít však značný podíl (až 20 %) na celkových oxidačních procesech v buňkách.

Energetickou účinnost respiračních procesů v živé rostlině můžeme v současné době studovat pomocí moderních fyzikálních metod. Převratnou událostí bylo zejména zavedení spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), která ve spojení s aplikací značeného fosforu (<sup>31</sup>P) umožňuje měřit rychlost tvorby či rozkladu ATP *in vivo*. Pokud současně měříme spotřebu kyslíku, můžeme vypočítat, kolik molekul ATP vzniklo na jednu přijatou molekulu kyslíku. Při nejefektivnější cytochromové cestě ve spojení s glykolýzou je tento poměr 6 ATP/O<sub>2</sub> (častěji se vyjadřuje jako ATP/O = 3). U alternativní cesty je ATP/O = 1, a u peroxidázového dýchání ATP/O = 0.

**Rychlost respirace** však měříme daleko nejčastěji klasickými metodami, a sice buď stanovením spotřeby kyslíku, nebo výdeje CO<sub>2</sub>. Již vzácněji se používá měření výdeje tepla pomocí speciálních kalorimetrů. Výdej CO<sub>2</sub> stanovujeme gazometrickými metodami, a to buď průtokovými (ze změny koncentrace CO<sub>2</sub> ve vzduchu po průchodu okolo uzavřené rostliny či orgánu - tedy stejně jako při měření fotosyntézy), nebo metodami neprůtokovými. Při nich vyloučený CO<sub>2</sub> jímáme do vhodného roztoku hydroxidu a poté jej kvantitativně stanovíme titračně. Existuje ovšem řada dokonalejších metod, při kterých měříme změnu objemu či tlaku vzduchu způsobenou respiračním příjmem O<sub>2</sub> a absorbcí vyloučeného CO<sub>2</sub> v uzavřeném systému (volumetrické a manometrické metody, např. klasický Warburgův přístroj). Velmi rozšířené je stanovení rychlosti respirace ze spotřeby kyslíku polarografickou metodou (Clarkovo čidlo), a to obvykle při ponoření měřeného orgánu do vhodného roztoku. Práce v roztocích umožňuje snadnou aplikaci specifických inhibitorů jednotlivých respiračních cest, stanovení podílu těchto cest na celkové rychlosti respirace, a tedy i odhad celkové energetické účinnosti oxidačních procesů.

Uvedené metody můžeme s výhodou kombinovat. Zejména je užitečné měřit současně výdej CO<sub>2</sub> a spotřebu kyslíku, a z toho pak vypočítat *respirační kvocient (RQ)*:

$$RQ = \frac{\text{vyložený CO}_2 \text{ (mol kg}^{-1}\text{)}}{\text{přijátý O}_2 \text{ (mol kg}^{-1}\text{)}}$$

Pokud prodýchávaný substrát pochází ze sacharidů (což je nejčastější případ), pak RQ = 1. Při oxidaci vysoce redukováných sloučenin je hodnota RQ nižší (pro většinu lipidů je RQ přibližně 0,7, u proteinů 0,8). Naopak, pro více oxidované sloučeniny může být i vyšší než jedna (např. pro kyselinu citronovou jako substrát je RQ = 1,33).

## Asimilace dusíku

Dusík je vůbec nejhojnější minerální živinou, kterou rostlina přijímá a svým obsahem v rostlinné biomase je na čtvrtém místě - hned za uhlíkem, kyslíkem a vodíkem. Síra je zastoupena sice méně (asi jeden gram v kilogramu sušiny), ale stejně jako dusík je nepostradatelnou součástí bílkovin a řady dalších stavebních součástí rostlin. Oba prvky jsou přijímány z půdního roztoku nejčastěji ve značně oxidované formě (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) a před inkorporací do organických molekul spotřebuje rostlina hodně energie na jejich redukci. Člověk ani ostatní živočichové nejsou schopni redukce nitrátů a síranů a proto jsou zcela odkázáni i z tohoto hlediska na činnost rostlin.

### Fixace molekulového (plynného) dusíku

Ačkoliv vzduch v atmosféře je tvořen převážně dusíkem a plynný dusík je ve vysoké koncentraci přítomen i uvnitř rostlin, přesto je to prvek, jehož nedostatek nejčastěji limituje rychlost metabolických procesů. Molekulový dusík totiž vyšší rostliny nedovedou přímo využívat k asimilaci (fixaci) do organických sloučenin. Tuto schopnost však mají některé prokaryotní organismy. Především jejich činnosti vděčíme za zásoby využitelných dusíkatých sloučenin, které se vyskytují v ekosféře.

Fixaci dusíku mohou provádět jednak některé mikroorganismy žijící volně v půdě (např. rodu *Azotobacter* a *Clostridium*), nebo v rhizosféře některých trav (zvláště bakterie rodu *Azospirillum* a *Azotobacter*). Nejvýznamnější jsou však bakterie, které fixují dusík při pevném symbiotickém spojení s kořeny některých druhů vyšších rostlin. Jde především o bakterie dříve zahrnované do rodu *Rhizobium* (je nyní rozčleněn do řady samostatných rodů). Symbiotické fixace dusíku jsou schopny i některé aktinomycety (*Frankia* spp.) a sinice (*Anabaena*, *Nostoc*). K hostitelským rostlinám patří většina druhů čeledi *Fabaceae*, dále pak některé stromy a keře z celkem asi 23 rodů (např. *Alnus*, *Myrica* a *Hippophae*).

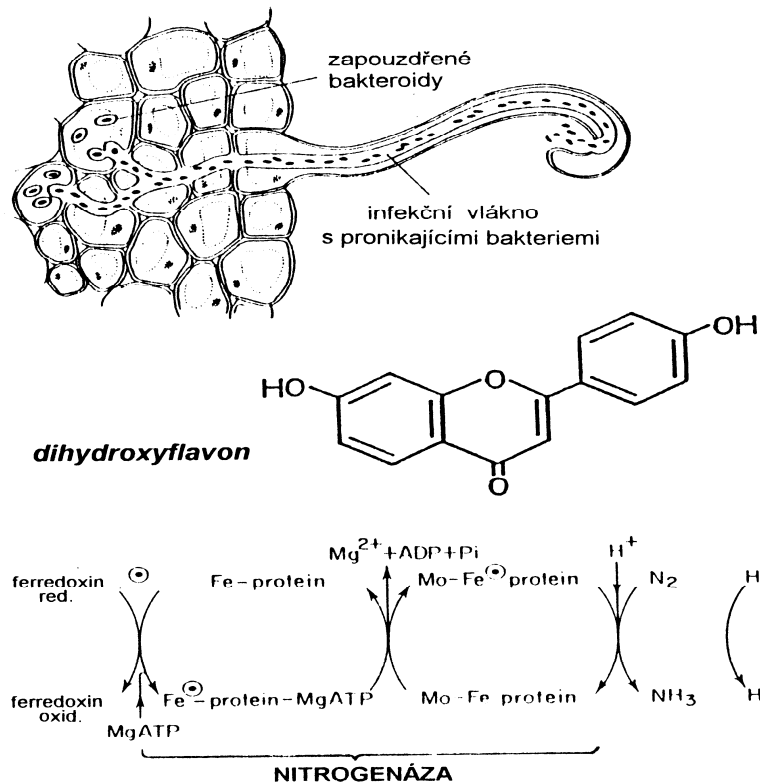
Podívejme se trochu blíže na průběh nejčastější a také nejdůležitější symbiotické fixace dusíku bakteriemi z okruhu bývalého rodu *Rhizobium*. Těchto bakterií známe celou řadu druhů a často se vyznačují specifickou afinitou jen k určitým druhům hostitelských rostlin. Vyskytují se běžně v půdě jako saprofytní organismy bez fixační aktivity. Při kontaktu s kořenem vhodné hostitelské rostliny pronikají po enzymatickém narušení buněčné stěny do buněk epidermis (obvykle do kořenového vlásku), a pak dále až do vnitřních vrstev kůry. Tam stimulují expresi řady specifických genů v buňkách korového parenchymu kořene (viz rámeček na následující straně), což vede k množení buněk infikované části kořene. Výsledkem obnovené dělivé aktivity je vznik kořenových hlízek o velikosti asi 2 až 4 mm.

Bakterie se usazují v cytoplazmě vnitřních (obvykle tetraploidních) buněk hlízek. Usazené (nedělivé) a poněkud zvětšené bakterie nazýváme *bakteroidy*. Jednotlivé bakteroidy, někdy ale i skupiny několika bakteroidů jsou obaleny *peribakteroidní membránou*, která vzniká invaginací plazmatické membrány hostitelské buňky a vytváří útvar označovaný jako *symbiosom*. V cytosolu buněk s bakteroidy se vytváří zvláštní protein (*leghemoglobin*) červené barvy, který reguluje hospodaření s kyslíkem. Ten je sice potřeba dodávat ve velkém



množství k respiračním centrům v obvodové membráně fixujících bakteroidů, ovšem velmi selektivně, neboť ve vnitřním prostoru, kde probíhá vlastní fixace dusíku, musí být udržována koncentrace kyslíku na velmi nízké úrovni. Klíčový enzym fixace, *nitrogenáza*, je totiž vyšší koncentrací kyslíku nevratně ničen. Na druhé straně terminální oxidáza v bakteriálním dýchacím řetězci má ke kyslíku mimořádně vysokou afinitu.

Je nutné zdůraznit, že celý proces vzniku symbiotického vztahu (migrace bakterií v půdě ke vhodným kořenům, tvorba hlízek a usazení bakterií v buňkách), probíhá za složité interakce hostitelské rostliny s bakteriemi, podložené specifickými komplexy desítek genů u obou partnerských organismů.

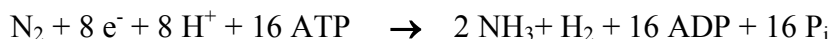


Pronikání bakterií rodu *Rhizobium* do kořenů hostitelské rostliny, struktura jedné ze sloučenin vylučovaných z kořenů vojtěšky (vábíček bakterie), a schéma vlastní redukce dusíku.

**PRŮBĚH VZNIKU SYMBIOTICKÉ VAZBY:**

1. vylučování druhově specifických **flavonoidních látek** z kořenů hostitelské rostliny,
2. **specifické reakce vyvolané flavonoidy u vhodného druhu bakterií:**
  - chemotaxe (chemicky vyvolaný pohyb směrem ke kořenům),
  - indukce exprese skupiny **nod-genů**, což vede ke tvorbě specifických oligosacharidů typu lipochitinů, označovaných jako **nod-faktory**
3. **specifické reakce pod vlivem nod-faktorů v hostitelské rostlině :**
  - tvorba **lectinů** (= proteiny s vazebnými místy pro sacharidy) na povrchu kořenových vlásků - usnadňují vazbu a průnik bakterií do kořene,
  - tvorba specifických proteinů **nodulinů** v kořenech (jsou nutné pro tvorbu hlízek a zabezpečení fixačního procesu),
4. průnik bakterií do buněk kůry infekčním vláknem, růst hlízek,
5. tvorba **bakteroidů** (= zapouzdřených bakterií) a **leghemoglobinu** v hostitelských buňkách,
6. vlastní fixace N<sub>2</sub>

**Redukce molekulového dusíku** probíhá v bakterioidech, které jsou hostitelskou rostlinou zásobovány sacharidy. Redukce dusíku na amoniak je energeticky mnohem náročnější, než např. redukce CO<sub>2</sub>. Na každou molekulu N<sub>2</sub> je zapotřebí dodat minimálně 8 elektronů (z toho 6 na tvorbu NH<sub>3</sub> a 2 na současně probíhající tvorbu H<sub>2</sub>), a dále energii z 16 molekul ATP. Souhrnně lze celou reakci vyjádřit:



Celý proces je katalyzován **nitrogenázou**, což je enzymový komplex složený ze dvou částí označovaných jako Fe-protein a Mo-Fe-protein. Ty se ještě dělí na několik podjednotek s redoxními skupinami typu Fe-S. Nitrogenáza je přiváděna do aktivního, redukováného stavu pomocí elektronů přenášených k ní z jiných metabolických procesů. Posledním donorem elektronů bývá obvykle feredoxin nebo flavodoxin. Při přenosu elektronů v nitrogenáze je nutný i hořčík navázaný na ATP.

Amonné ionty transportované z bakteroidů jsou přímo v cytoplasmě hostitelských buněk zabudovány do organických sloučenin (nejčastěji glutamin, glutamát a asparagin) a ty jsou pak vedeny xylémem do nadzemních částí rostliny. V listech jsou převážně použity k syntéze dalších aminokyselin. Část z těchto produktů je transportována zpět do kořenů.

Mezi fixační aktivitou jednotlivých druhů a kmenů symbiotických bakterií mohou být značné rozdíly. Proto se věnuje v současné době mimořádně velká pozornost nalezení těch nejefektivnějších mikroorganismů (selekcí, genovými manipulacemi). Nemenší úsilí se také věnuje nalezení nejvhodnějších hostitelských rostlin. Existují totiž velké genotypové rozdíly v počtu vytvářených hlízek na jednotku kořenů a rostlina také do značné míry může řídit rychlost fixace N<sub>2</sub> v hlízkách. Tato rychlost se podstatně mění v průběhu ontogeneze - nejvyšší je vždy v období tvorby semen.

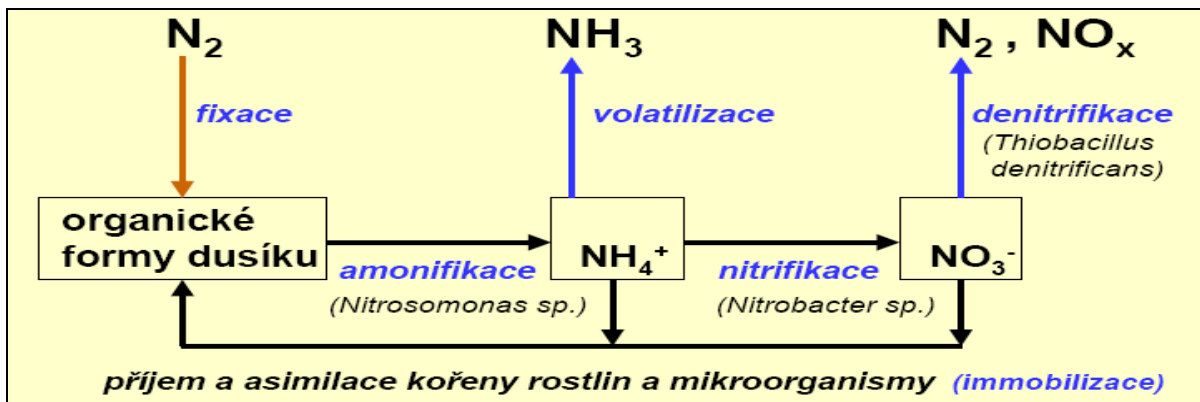
Množství symbioticky fixovaného dusíku se snižuje při vyšším obsahu anorganických forem dusíku v půdě. Je to vcelku pochopitelné, neboť příjem nitrátových či amonných iontů z půdy je pro rostliny méně energeticky náročný, než fixace N<sub>2</sub>. Naopak, zvýšený obsah fosforu v půdě působí na rozvoj symbiotické fixace stimulačně. Roční úhrnné množství fixovaného dusíku za optimálních podmínek může dosahovat až 400 kg čistého N na hektar, což se zcela vyrovná dávkám dusíku dodávaných do půdy formou umělých hnojiv při intenzivní agrotechnice těch plodin, které symbiotickou fixaci nemají. Jinými slovy, symbiotická fixace je schopna plně saturovat dusíkem hostitelské rostliny, což je v přírodních ekosystémech výhodné při kolonizaci území s extrémně malým obsahem dusíku v půdě.

**Měření rychlosti fixace dusíku** se obvykle provádí ze stanovení aktivity nitrogenázy, kdy využíváme její schopnosti redukovat i jiné sloučeniny, než je dusík (stanovení malých změn koncentrace dusíku ve vzduchu je totiž velmi obtížné). Nejčastěji používáme acetylen, přidávaný ke vzorkům kořenů či půdy v uzavřené nádobce. Vznikající etylen lze vysoce citlivě měřit pomocí plynové chromatografie.

### **Asimilace nitrátů a amonných iontů**

Schopnost symbiotické fixace dusíku je vyhrazena poměrně malé skupině rostlin - všechny ostatní jsou odkázány na příjem dusíkatých sloučenin z půdy. Nejčastěji se jedná o nitráty, nitrity a amonné ionty, které v půdě vznikají z půdní organické hmoty činností mikroorganismů (= mineralizace dusíku). Při rozkladu organických látek vznikají nejprve amonné ionty (**amonifikace**). Ty se dále mohou oxidovat na nitrity (bakteriemi rodu *Nitrosomonas*) a dále na nitráty (*Nitrobacter*) v procesech souhrnně označovaných jako **nitřifikace**. Při nedostatku kyslíku v půdě může docházet k mikrobiálnímu rozkladu dusičnanů na molekulový dusík či na plynné oxidy dusíku (**denitrifikace**) a tím i ke ztrátám dusíku z půdy.

Je to tedy především dynamika půdní mikroflóry, která rozhoduje o množství a typu sloučenin dusíku v půdě. Činnost mikrobů je ovšem řízena podmínkami prostředí. Tak například za nízké teploty a nízkého pH půdy je značně zpomalena nitrifikace (tvorba nitrátů) a hromadí se pouze amonné ionty, neboť amonifikační mikroflóra je mnohem odolnější k nepříznivým vlivům. Většinou však mají rostliny k dispozici současně různé přijatelné formy anorganických sloučenin dusíku.

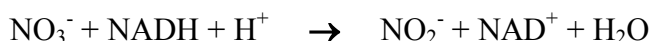


Nitrátové ionty přijaté z půdy nemůže rostlina zabudovat do organických látek svého těla přímo, ale až po redukcí na ionty amonné. K této redukcí může docházet u některých druhů přímo v kořenech, u jiných až v listech. Místo redukcí lze zjistit jednak analýzou xylémové šťávy, jednak stanovením aktivity enzymu nitrátreduktázy v příslušných orgánech. Avšak také u druhů, které obvykle redukcí veškeré nitráty v kořenech, může někdy docházet k jejich transportu do listů, a to v těch případech, kdy aktivita nitrátreduktázy v kořenech je buď snížena (např. nízkou teplotou), nebo je nedostatečná vzhledem ke zvýšenému příjmu nitrátů. Redukci nitrátů lze popsat souhrnnou rovnicí:



Již z prvního pohledu na tuto rovnici je zřejmé, že jde o velmi náročnou redukcí (oxidační číslo dusíku se mění z +5 na -3 !). Také je užitečné si všimnout, že se spotřebovává více vodíkových iontů než elektronů. Úbytek vodíkových iontů v cytosolu vede k jeho alkalizaci. Pro zachování optimálního pH v buňkách jsou tedy nezbytné jisté kompenzační mechanismy. U kořenů obvykle dochází ke sníženému výdeji  $H^+$  do půdního roztoku a naopak ke zvýšenému vylučování  $OH^-$  a aniontů organických kyselin (pH půdy v okolí kořenů se tedy zvyšuje!). Redukce nitrátů v listech je provázána také zvýšenou tvorbou organických kyselin (zvláště kyseliny jablečné ze sacharidů přes fosfoenolpyruvát a kyselinu oxaloctovou). K těmto reakcím dochází vcelku samovolně, neboť aktivitu PEP-karboxylázy stimuluje zvýšené pH. Celý reakční systém bývá označován jako *biochemický pH-stat*.

Při bližším pohledu na redukcí nitrátů v rostlinách zjistíme, že jde vlastně o dvě navazující reakce. Tou první je redukcí nitrátu na nitrit:



Tato reakce probíhá za účasti enzymu nitrátreduktázy v *cytosolu buněk* (ne v organelách).

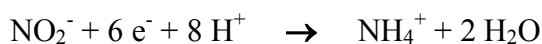
**Nitrátreduktáza** je klíčovým enzymem při asimilaci nitrátů v rostlinách, neboť nejvíce rozhoduje o její celkové rychlosti. V každé buňce se vyskytuje v několika formách (s odlišně kódovanými proteiny), ovšem s velmi podobnou základní strukturou i funkcí. Jedná se o komplex složený ze dvou totožných podjednotek (homodimer). Každá z nich obsahuje tři funkční skupiny: *FAD*, *hem* a *molybdenový komplex*.

Množství nitrátreduktázy v rostlinách silně kolísá v závislosti na genotypu i na celé řadě faktorů prostředí. Především existují velké rozdíly v *potenciálních* (maximálně

dosažitelných) hodnotách aktivity nitrátoreduktázy. Některé ruderalní druhy (např. kopřiva, *Urtica dioica*) mohou dosahovat hodnot až stonásobně vyšších než některé vřesovištní rostliny (např. borůvka, *Vaccinium myrtillus*), které jsou adaptovány k růstu na substrátech velmi chudých na nitrátovou formu minerálního dusíku. Tyto druhy pak nejsou schopny výrazněji zrychlit a využívat nitráty ani při jejich dodání do substrátu ve větším množství.

Ale i u těže rostliny či listu se *aktuální hodnoty* aktivity nitrátoreduktázy mohou rychle měnit i v průběhu dne. Vzhledem k velmi krátké životnosti tohoto enzymu (poločas rozpadu je jen několik hodin), v buňkách současně probíhá jak syntéza, tak i rozklad (proteolytickými enzymy). Rychlost syntézy a tudíž i dosažitelná aktivita nitrátoreduktázy je v přímé závislosti na množství nitrátů v buňce. Jedná se tedy o typický případ *indukce enzymatické aktivity substrátem*, která je jinak u vyšších rostlin velmi vzácná (na rozdíl od bakterií, kde je běžná). Aktivita tohoto enzymu je také stimulována světlem - jednak díky vyšší produkci reduktantů (může být využíván jak NADH, tak i NADPH, v závislosti na dané formě enzymu), ale pravděpodobně i jinými, na světle závislými mechanismy (na základě informací zprostředkovaných fytochromovým systémem, jak bude blíže vysvětleno ve třetí části učebních textů). Stimulace světlem je ale podmíněna přítomností nitrátů v buňce - pouze tedy umocňuje účinek substrátové indukce. Nicméně v nočních hodinách je asimilace nitrátů v nadzemních částech rostlin vždy velmi zpomalena a tudíž tam dochází k jejich hromadění.

Navazující *redukce nitritu* na amonný ion probíhá u listů v chloroplastech, u jiných orgánů pak v proplastidech. Nejlépe je průběh tohoto procesu prozkoumán v plastidech listů. Zde se totiž využívá primárních reakcí fotosyntézy a všech šest potřebných elektronů je přenášeno z ferredoxinu pomocí enzymu *nitritoreduktázy*:



Při redukci nitritů v kořenech a v jiných nezelených orgánech je donorem elektronů NADH či NADPH, produkované respiračními procesy. Některé nové práce naznačují, že i v tomto případě se podílí na přenosu elektronů na nitritoreduktázu protein velmi podobný ferredoxinu.

**Amonné ionty**, ať už vytvořené popsanou redukcí nitrátů či přímo přijaté kořeny z půdy, působí nepříznivě na buněčný metabolismus (zejména inhibují membránové procesy včetně tvorby ATP) a proto jejich rychlá vazba do dalších sloučenin (u příjmu z půdy přímo v kořenech) je životně důležitá. V buňkách listů se navíc uvolňuje velké množství amonných iontů v průběhu glykolátového (fotorespiračního) cyklu, které je také nutno opět vázat do organických dusíkatých látek.

První reakcí asimilace amonných iontů je obvykle tvorba *glutaminu* (amidovou vazbou na glutamát) za účasti enzymu *glutamínsyntetázy* (označované zkratkou GS). Tato reakce probíhá v cytosolu za spotřeby jedné molekuly ATP. Za dostatku amonných iontů v buňkách glutamin reaguje s 2-oxoglutarátem (který je produkován v mitochondriálním citrátovém cyklu) za vzniku glutamátu (viz schéma v rámečku). Tato reakce katalyzovaná *glutamátsyntázou* (GOGAT) probíhá v plastidech a vyžaduje dodání redukčního činidla, kterým v chloroplastech listových buněk bývá redukovaný ferredoxin (produkovaný v primárních procesech fotosyntézy), v buňkách kořenů pak NADH. Část takto produkovaného glutamátu je využita opět jako akceptor amonných iontů pro další cyklus jejich asimilace.

Další část je ovšem využívána pro tvorbu jiných dusíkatých látek, v první řadě různých aminokyselin (aminoskupina glutamátu může být snadno přenášena transaminací na různé organické kyseliny) a z nich pak se syntetizují hlavně bílkoviny. Bohaté na dusík jsou nukleové kyseliny i mnoha sekundárních metabolitů a zásobních látek. Velmi významnou dusíkatou látkou je také *glutathion*, jehož stálá zásoba v chloroplastech slouží jednak jako antioxidant, ale i jako substrát pro syntézu řady jiných dusíkatých sloučenin. Cesty syntéz těchto dusíkatých sloučenin v rostlinách jsou již problematikou čistě biochemickou.



## Asimilace amonných iontů

### Nejčastější cesta:



### Za velmi nízkých koncentrací $\text{NH}_4^+$ :



### Za velmi vysokých koncentrací $\text{NH}_4^+$ :



Velmi zjednodušené schéma tří různých cest asimilace amonných iontů v rostlinných buňkách.

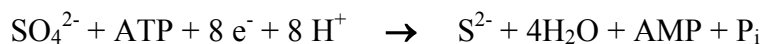
Z fyziologického hlediska je velmi zajímavé sledovat změny v obsahu dusíkatých látek v různých orgánech během růstu. Mladé klíčící rostliny získávají veškerý dusík ze zásobních bílkovin uložených v semeni (*proteinová tělíska*). Velmi rychle po začátku klíčení jsou zásobní proteiny hydrolyzovány na aminokyseliny a amidy, ze kterých jsou opět syntetizovány nové druhy proteinů a dalších látek.

Celý další růst a vývoj rostliny je provázen maximální úsporností v hospodaření s organicky vázaným dusíkem. Zvláště dramatické změny nastávají při stárnutí orgánů a při tvorbě semen či plodů. Funkce rostliny za těchto situací směřují k translokaci dusíku do místa největší potřeby z ostatních svých částí. Protože nejvíce dusíku je vázáno v bílkovinách, dochází v první řadě k jejich rozkladu. Ze stárnoucího listu, dříve než uschne, může být translokováno do mladých či zásobních orgánů až 85 % veškerého dusíku.

Při tvorbě semen a plodů u rostlin nedostatečně zásobených dusíkem je měřitelný pokles fotosyntézy listů. Tento na první pohled paradoxní jev se dá vysvětlit právě přednostním zásobením reprodukčních orgánů dusíkatými látkami odebranými z listů (tedy i z části karboxylačních enzymů po jejich rozkladu), a to i za cenu snížené tvorby sacharidů.

## Asimilace síranů a fosforečnanů

**Síra** je nejčastěji přijímána z půdy v podobě síranů a jejich asimilace v rostlině má některé podobnosti s asimilací nitrátů. Je to také energeticky velmi náročný proces, který souhrnně můžeme vyjádřit takto:



K redukcí síranů obvykle dochází v chloroplastech listů, v omezené míře může probíhat i v kořenech (v proplastidech). Síranový iont se nejprve váže na ATP za vzniku adenosin-5-fosfosulfátu (APS) a jedné molekuly pyrofosfátu. Ta se však záhy rozpadá na dva fosfátové ionty. Teprve pak dochází k vlastní redukcí přenosem elektronů - u listů je donorem feredoxin. Je zapotřebí celkem osmi elektronů, neboť oxidační číslo síry se mění z +6 na -2. *Produktem redukce je siričkový iont, který je ale hned vestavěn do aminokyseliny cysteinu.*

Rostliny jsou schopny využívat anorganické zdroje síry i ve formě plyných sloučenin (především oxidu siřičitého, pokud nedosahuje toxicky zvýšené koncentrace). Molekuly  $\text{SO}_2$  po vstupu průduchy do listu reagují s vodou za vzniku siřičitanových iontů, které jsou v chloroplastech redukovány obdobným způsobem, jak bylo uvedeno u síranů.

Naprostá většina asimilované síry je použita ke tvorbě aminokyselin **cysteinu** a **methioninu**, které jsou pravidelnou součástí bílkovin i některých oligopeptidů. Síra je součástí řady redoxních sloučenin i mnoha sekundárních metabolitů, zejména silic.

**Asimilace fosforu** rostlinami je poměrně jednoduchá, protože fosfor - na rozdíl od dusíku a síry - zůstává téměř stále v plně oxidovaném stavu. Z půdy je přijímán jako dihydrogenfosfátový iont ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), pouze ve výjimečných případech (za vysokého pH) jako  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Koncentrace těchto iontů v půdním roztoku jsou vždy extrémně nízké (0,5 až 2  $\mu\text{M}$ ) a proto příjem obvykle vyžaduje metabolickou energii.

Po vstupu do cytoplasmy kořenových buněk jsou fosfátové ionty rychle esterifikovány do ATP. Část z nich je pak ještě v kořenech využita na syntézu fosfolipidů, DNA a RNA, část se ukládá jako zásoba do vakuol. V cytosolu se stabilně udržuje jen velmi nízká koncentrace.

Z kořenů může být fosfor transportován do nadzemních orgánů jak ve formě volných fosfátových iontů, tak i vázaný v ATP. U většiny rostlin jsou však na delší vzdálenosti transportovány přednostně anorganické formy fosforu, zatímco uvnitř buněk (např. mezi organelami) převládá výměna ATP a ADP. Při stárnutí listů je asi 60 % z jejich celkového obsahu fosforu odvedeno lýkem do jiných orgánů.

Vzhledem k nízké koncentraci fosforu v cytoplasmě je doba jeho obratu v metabolických procesech velmi krátká (jen asi 5 minut). Daleko nejvíce fosfátových iontů cykluje při fotosyntéze a při všech dalších syntézách složitějších sacharidů, zbytek pak při syntéze a obměnách fosfolipidů, RNA a DNA.

## **Kontrolní otázky ke 2. části učebního textu Fyziologie rostlin**

1. Jaké jsou hlavní typy proteinových komplexů v thylakoidních membránách chloroplastů a které z nich se nacházejí jen v jejich části volně komunikující se stromatem?
2. Z jakých hlavních částí je složen fotosystém II v thylakoidech?
3. Jaké jsou hlavní *funkční* rozdíly mezi chlorofyly a karotenoidy?
4. Jakým mechanismem je zajištěna jednosměrnost přenosu excitační energie z antén do reakčního centra fotosystémů?
5. Jaké dílčí fotochemické reakce vedou k hromadění vodíkových iontů v lumen thylakoidu?
6. Jakým způsobem může cytochromový komplex přispívat k vyšší energetické účinnosti primárních (fotochemických) procesů fotosyntézy?
7. Jaké odlišné typy redukčních procesů mohou probíhat v chloroplastech s využitím redukované formy ferredoxinu?
8. Popiš průběh cyklického transportu elektronů v thylakoidních membránách. K tvorbě jakých primárních metabolitů vede?

9. Co rozumíme pod pojmem "nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu" a čím je způsobeno?
10. Jaké jsou tři hlavní fáze fotosyntetického cyklu redukce uhlíku (Calvinův cyklus)?
12. Jaké faktory podmiňují aktivaci katalytické funkce enzymu Rubisco?
13. Popiš návaznost reakcí v glykolátovém cyklu (fotorespiraci).
14. Popiš návaznost reakcí ve fixační cestě C<sub>4</sub>. Jaké výhody tato cesta rostlinám přináší?
15. Popiš návaznost reakcí ve fixační cestě CAM.
16. Jaké biochemické zvláštnosti rostlin s fixační cestou CAM podmiňují jejich schopnost otvírat průduchy v nočních hodinách?
18. V jakých jednotkách nejčastěji vyjadřujeme množství fotosynteticky aktivního záření dopadajícího na rostliny?
19. Která část "světelné křivky" rychlosti fixace CO<sub>2</sub> je nejvíce ovlivněna účinností fotochemických procesů?
20. Jaké energeticky bohaté substráty jsou transportovány do mitochondrií rostlinných buněk a v nich pak využívány pro tvorbu ATP?
21. Jaké hlavní multiproteinové komplexy se nacházejí ve vnitřní membráně mitochondrií rostlinných buněk a jakou mají funkci?
22. Jaký význam může mít transport elektronů v mitochondriích alternativní (kyanid-resistentní) cestou pro rostlinné buňky?
23. Jaké maximální množství molekul ATP může vzniknout (fosforylací z ADP) v rostlinné buňce při úplném rozkladu jedné molekuly glukózy na CO<sub>2</sub> a vodu?
24. K jakým hlavním skupinám fyziologických procesů v rostlinách jsou využívány energeticky bohaté sloučeniny (hlavně ATP) produkované v mitochondriích?
25. Jaké hlavní vnitřní a vnější faktory mohou zvyšovat celkovou rychlost respiračních procesů?
26. Jaké typy chemických sloučenin se uplatňují při navazování symbiotických vztahů mezi hostitelskou rostlinou a vhodným typem hlízkových bakterií fixujících plynný dusík?
26. Jaké specifické proteiny či jiné metabolity jsou nutné pro zabezpečení fixační aktivity bakteroidů uvnitř kořenových hlízek?
27. Jaké pedochemické faktory (zejména koncentrace některých minerálních živin) mohou snižovat či zvyšovat symbiotickou fixaci dusíku?
28. Jaké hlavní skupiny půdních mikrobiálních procesů ovlivňují přeměny dusíkatých látek v půdě?
29. Ve kterých částech *buňky* (ne celé rostliny!) dochází k redukci nitrátů na amonné ionty?
30. Jaké faktory přispívají k aktivaci enzymu nitrátoreduktázy?
31. Na jakou chemickou látku se nejčastěji navazují amonné ionty při svém prvotním vstupu do organických vazeb?
32. Ve kterých částech buňky dochází k redukci síranů a k zabudování síry do organických vazeb a jaký je první stálý produkt toho procesu?