

# Biologie rostlinné buňky



**Oddělení  
experimentální  
biologie rostlin**

## 7. Chloroplasty

- ▶ Objev fotosyntézy a chloroplastů
- ▶ Struktura chloroplastů
- ▶ Izolace chloroplastů
- ▶ Složení chloroplastů
- ▶ Fotosyntéza
  - ▶ Bioenergetika fotosyntézy a uhlíkový cyklus
  - ▶ Světelné a uhlíkové reakce fotosyntézy
  - ▶ Fotorespirace, C4 a CAM metabolismus
- ▶ Genetický systém plastidů
- ▶ Transport proteinů do chloroplastů
  - ▶ Tic-Toc translokátory
- ▶ Biogeneze plastidů
- ▶ Ostatní plastidy
- ▶ Redukce dusičnanů a aktivace sulfátů v chloroplastech



## Objev fotosyntézy a chloroplastů

- ▶ Již **Empedokles** navrhoval, že rostliny asimilují vzduch ( $\text{CO}_2$ ), ale **Aristoteles** jej odmítl a nebral vážně....
- ▶ až do roku 1727, kdy **Stephen Hales** (anglický vědec a vynálezce) rostliny spálil a vyčíslil množství uvolněného plynu a popela.
- ▶ V 18. století **Joseph Priestley** náhodou zjistil, že snítka máty dokáže „vyčistit“ vzduch, který byl dříve znečištěn dýcháním zvířete nebo hořením svíčky v uzavřené nádobě.
  - ▶ Měl štěstí, že našel vývoj kyslíku rostlinami...
  - ▶ Ale experiment byl nereprodukovatelný možná proto, že nekontroloval světelné podmínky ve své laboratoři.
- ▶ **Théodore de Saussure** (1804) kvantifikoval vztah mezi fixací  $\text{CO}_2$  a vývojem  $\text{O}_2$  a dospěl k závěru, že voda musí být přijímána, věřilo se, že rostliny získávají C z humusu.
- ▶ **Hans Molisch** (1916) použil list jako fotografický papír.



# Objev fotosyntézy a chloroplastů

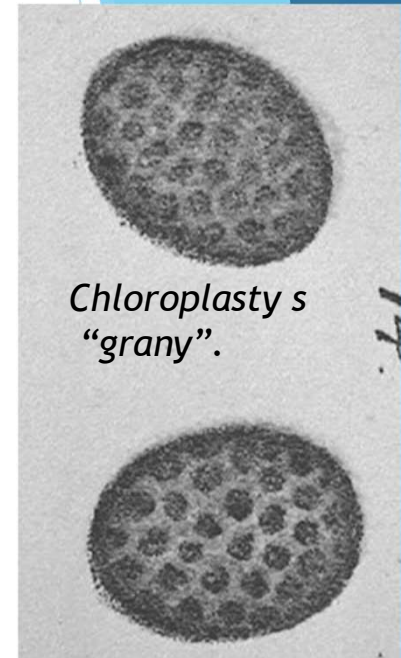
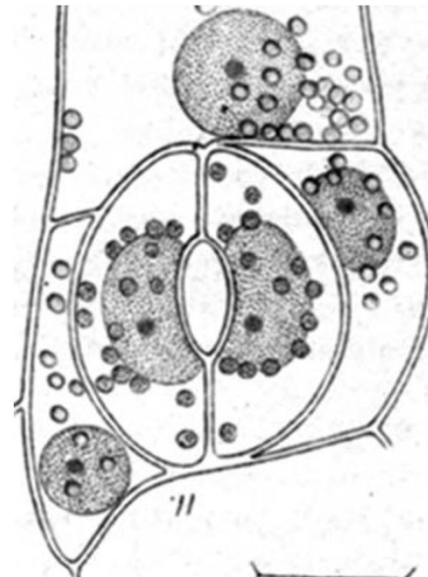
- ▶ V 19. století objeven zelený pigment *chlorofyl* (*chlorophyle*) z řečtiny = „zelený list“ a granule chlorofylu



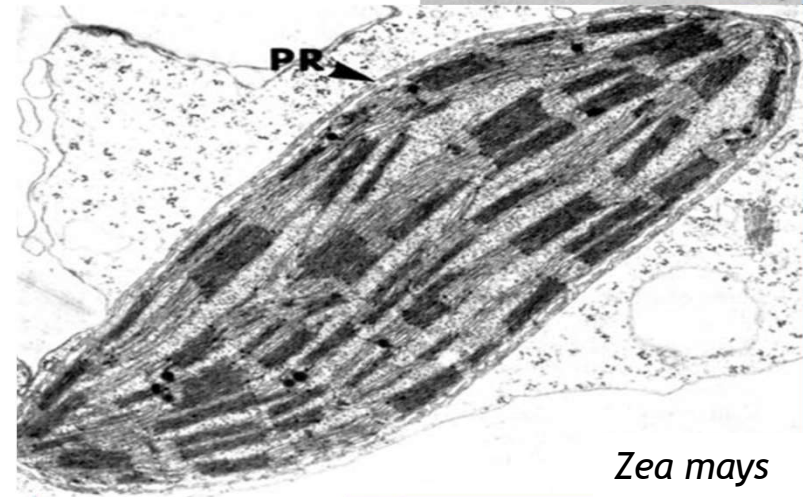
*Spirálový chloroplast Spirogyra quinina*

- ▶ Další objevené granule = plastidy
  - ▶ zelené plastidy, chloroplasty,
  - ▶ oranžovo-žluté plastidy chromoplasty,
  - ▶ číré plastidy leukoplasty.
- ▶ V 1950 letech elektronová mikroskopie a ultramikrotom odhalily strukturu *grana*,
  - ▶ složeno z membrán (7 až 9 nm) později pojmenovaných jako *thylakoidy* (z řeckého slova znamenajícího „sacklike“).

*Chloroplasty ve svěracích buňkách Tradescantia.*



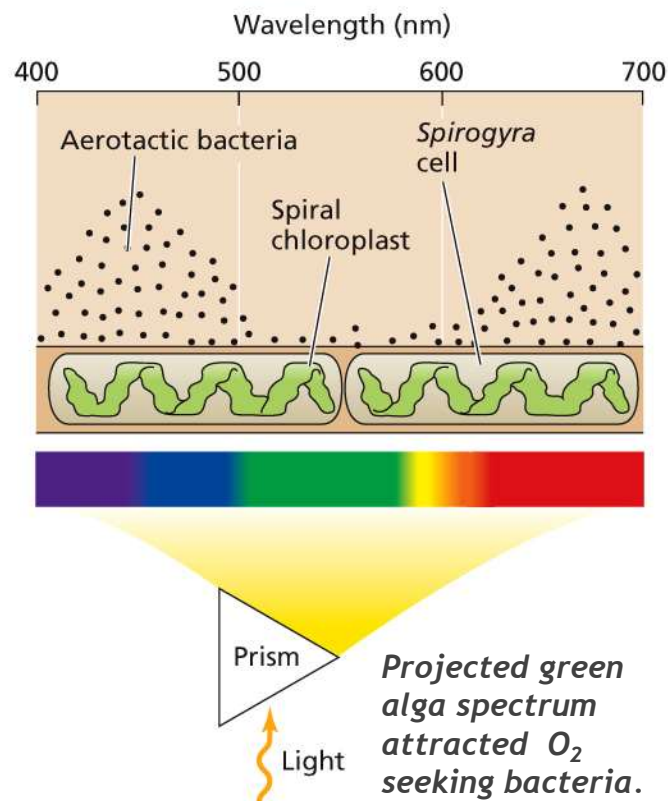
*Chloroplasty s "grany".*



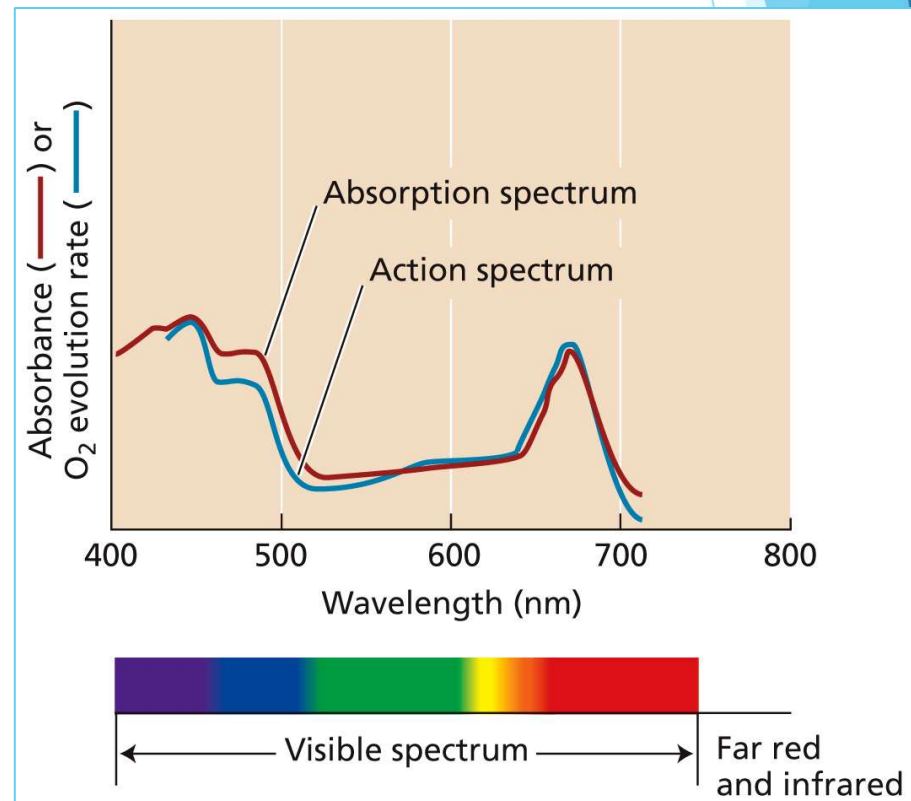
*Zea mays*

# Akční spektra spojují absorpci světla s fotosyntetickou aktivitou

▶ T.G. Engelmann, 1800

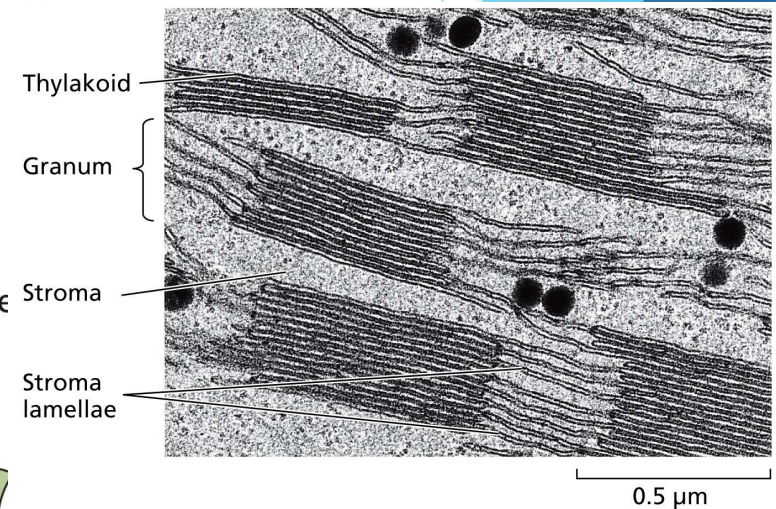
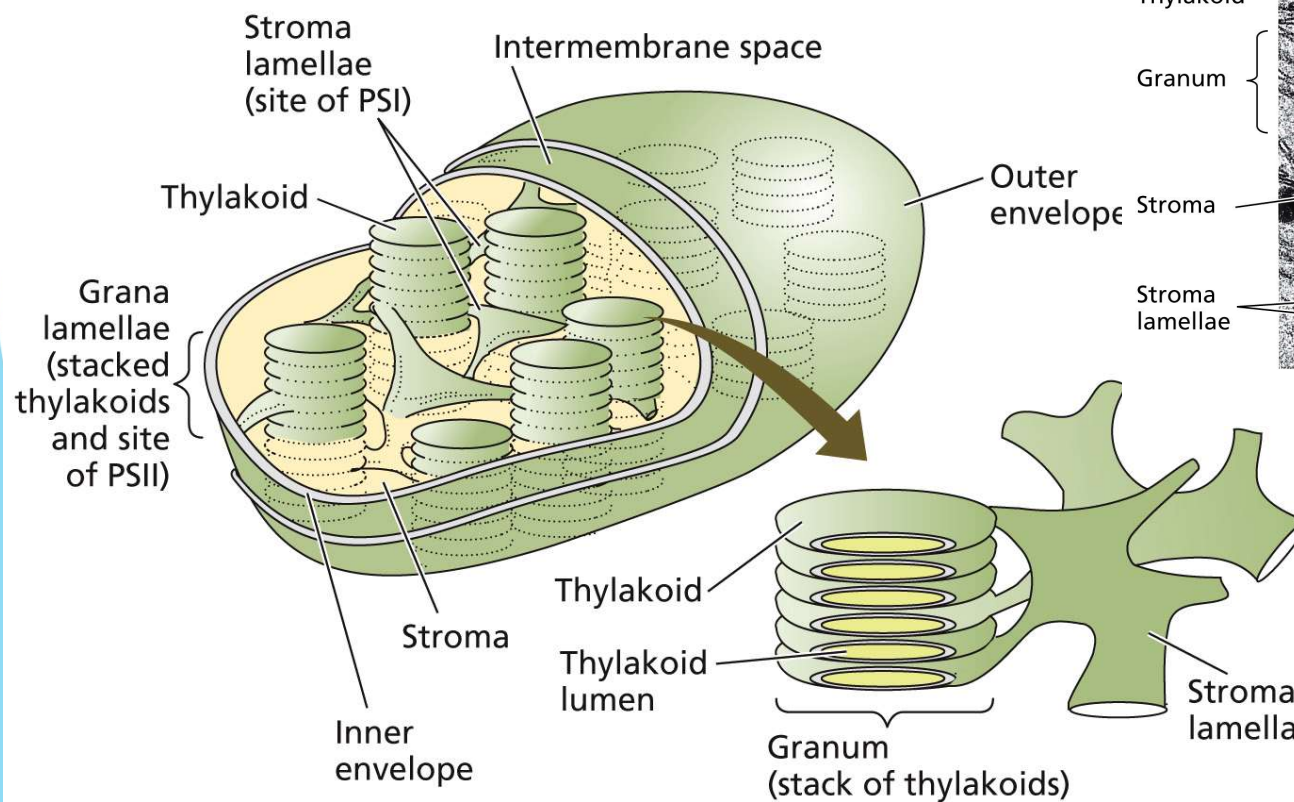


- ▶ Robert Hill (1937) izolované chloroplasty byly schopny vyvinout  $O_2$ , když byl přidán umělý akceptor  $e^-$ , což poskytuje důkaz, že chloroplasty jsou místem fotosyntézy.
- ▶ *Hillova reakce* ~ světlem stimulovaná redukce



# Chloroplast je místem fotosyntézy

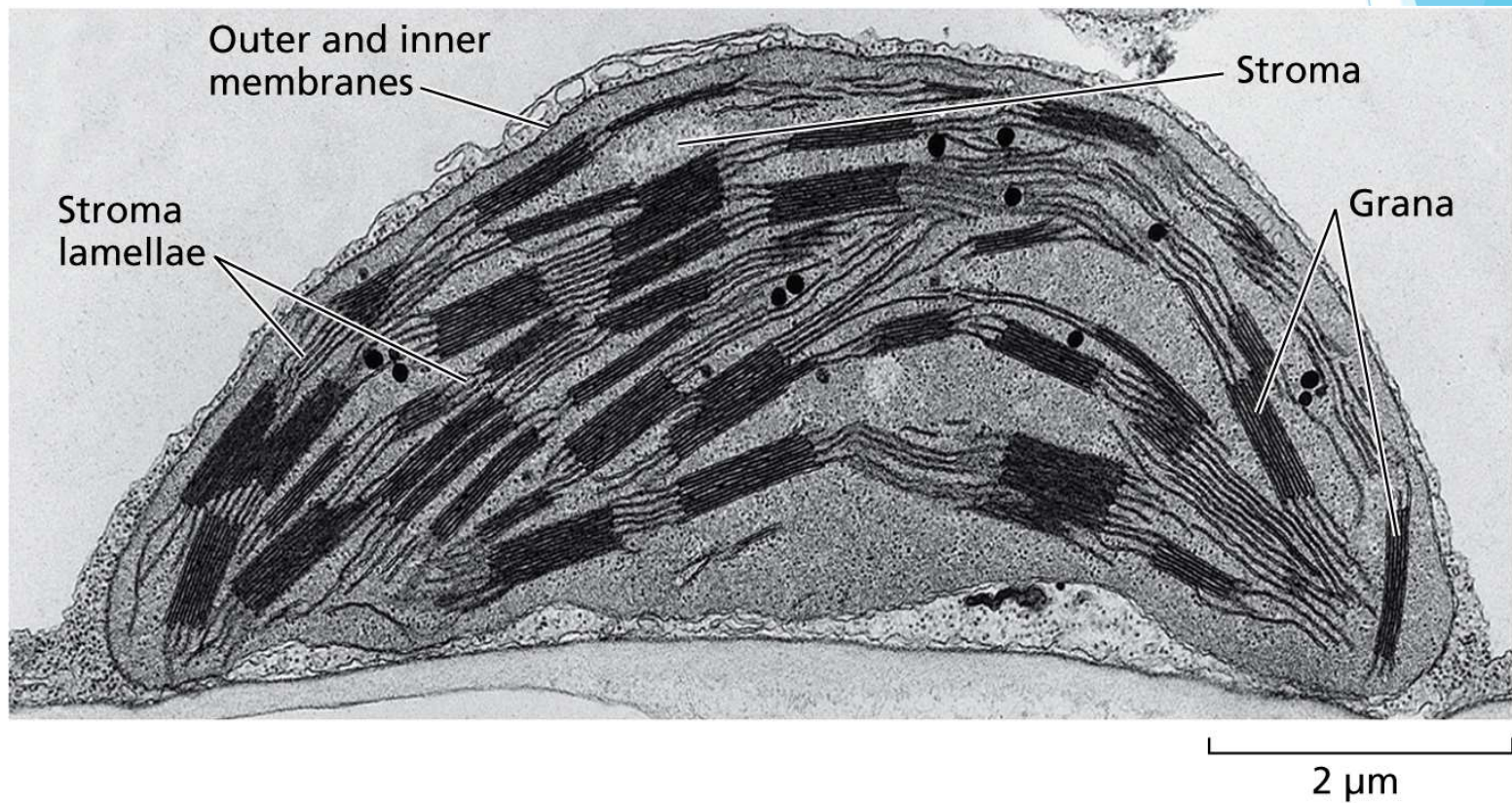
- ▶ Organely ohraničené dvojitou membránou = obal
- ▶ Membrány uvnitř chloroplastu = **tylakoidy**, tvoří **grana** (10-20 tylakoidů)
- ▶ Tekutinový obsah obklopující tylakoidy = **stroma**
  - ▶ **Grana lamellae** (stacked, PSII) a **stroma lamellae** (not stacked, PSI)

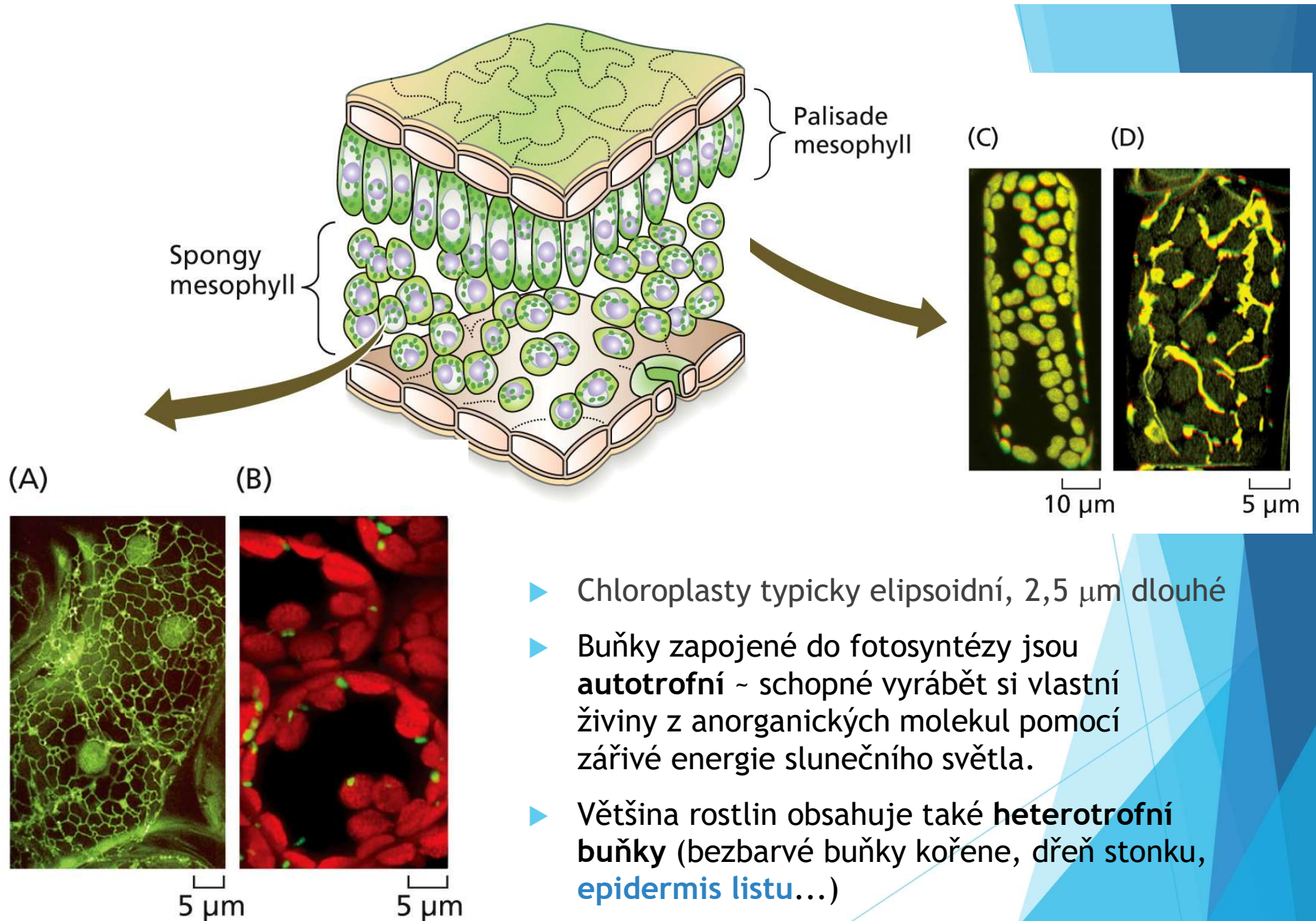


- ▶ Proteiny a pigmenty (chlorofyly a karotenoidy) podílející se na fotosyntéze jsou uloženy v tylakoidní membráně
- ▶ stroma obsahuje rubisco.

## Izolace chloroplastů

- ▶ Pletivo se homogenizuje, přefiltruje a centrifuguje při 6000-8000 g / 90 s.
- ▶ Dále oddělení chloroplastů od mitochondrií a peroxisomů odstředěním v gradientu hustoty Percollu při 500 g / 10 min.
- ▶ Neporušené chloroplasty se nacházejí jako zelený pás u dna zkumavky.
- ▶ Vnější a vnitřní membrány obalu a tylakoidy mohou být také odděleny.





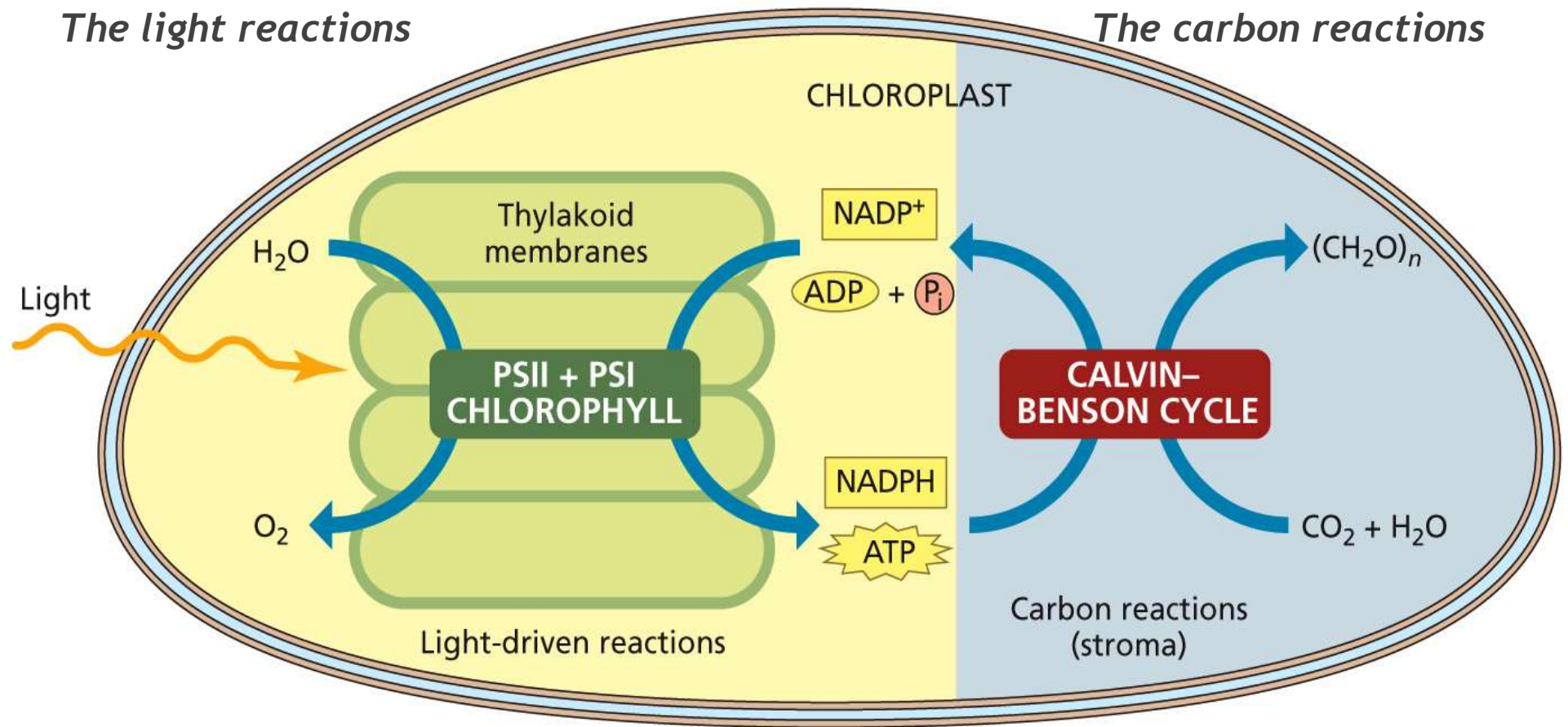


## Složení chloroplastů

- ▶ Lipidy tvoří 58 % suché hmotnosti chloroplastového obalu! **V. vysoká**
- ▶ *Glycerolipidy* tvoří většinu rostlinných lipidů, syntetizovaných v ER nebo v samotném plastidu (na membránách obalu).
- ▶ **Vnější obalová membrána** - velmi propustná a obsahuje řadu proteinů včetně pórového proteinu a *permeázy*, která usnadňuje transport lipidů, které jsou syntetizovány v ER do chloroplastu.
- ▶ **Vnitřní membrána** - odlišně propustná a obsahuje řadu proteinů pro transport metabolitů, např. *transportéry* pro substráty a produkty fotosyntézy, *aquaporiny* (propustnost membrány pro CO<sub>2</sub>).
- ▶ **Tylakoidní membrány** - chudé na fosfolipidy, ale bohaté na *galaktolipidy*, které se vyskytují pouze v této organelle, a lipidy obsahující síru.
  - ▶ *Sulfolipidy* (SL) také v membránách sinic, což poskytuje důkaz, že tyto organismy mohou mít společného předka s chloroplasty!
- ▶ Tylakoidní membrány obsahují mnoho proteinů zapojených do **světelných reakcí fotosyntézy**.
- ▶ Všechny enzymy nezbytné pro **temné reakce fotosyntézy** se nacházejí ve stromatu.

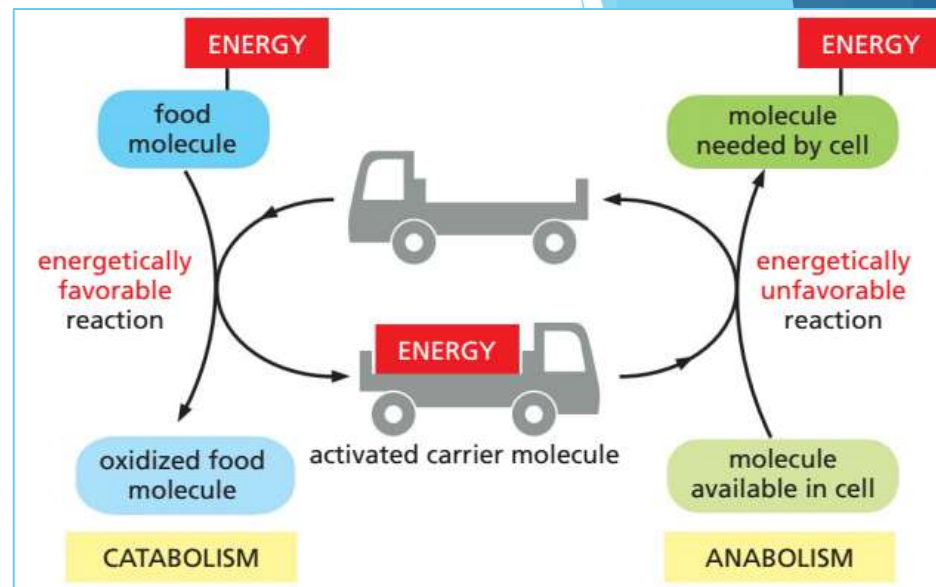
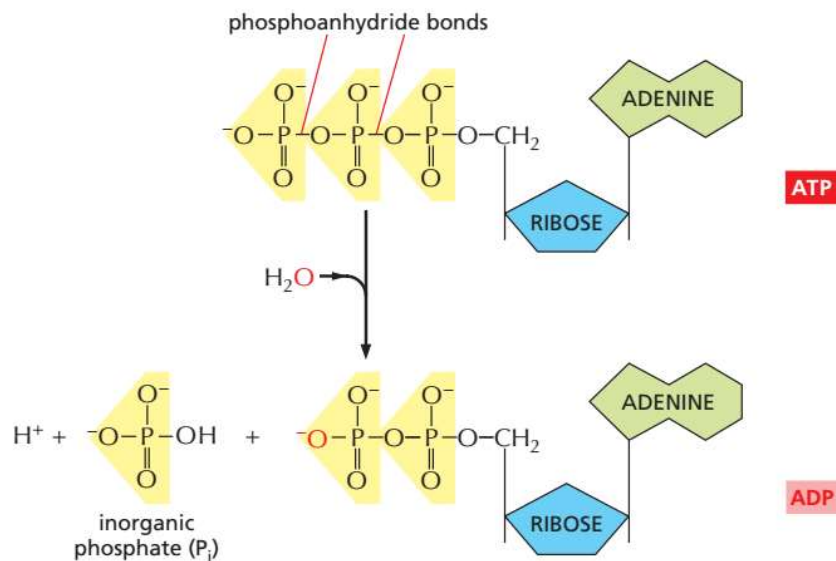
# Fotosyntéza

- ▶ Rostliny využívají sluneční energii k oxidaci vody, čímž uvolňují  $O_2$  a redukci  $CO_2$ , tvoří velké uhlikaté sloučeniny (cukry).
  - ▶  $6 CO_2 + 6 H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6 O_2$
- ▶ Nejvíce fotosyntetizujícím pletivem vyšších rostlin je listový mezofyl obsahující chloroplasty a chlorofyly absorbující světelnou energii.

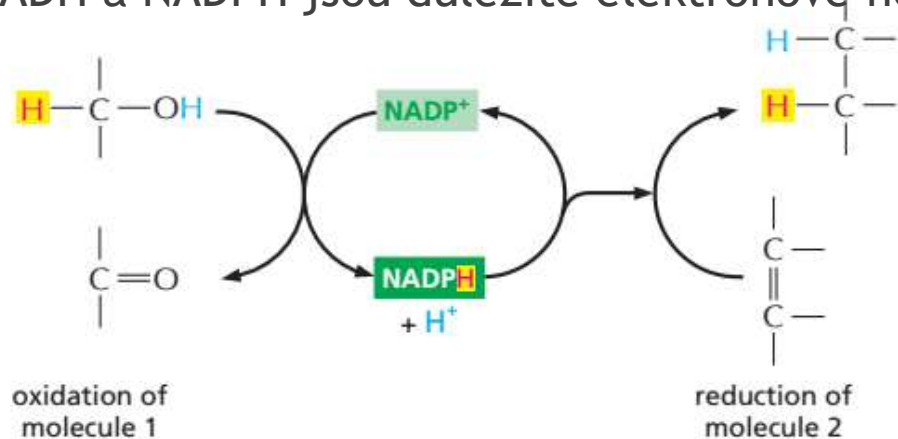


# ATP je nejrozšířenější aktivovaný přenašeč energie

- Hydrolyzáza ATP na ADP a anorganický fosfát (Pi).



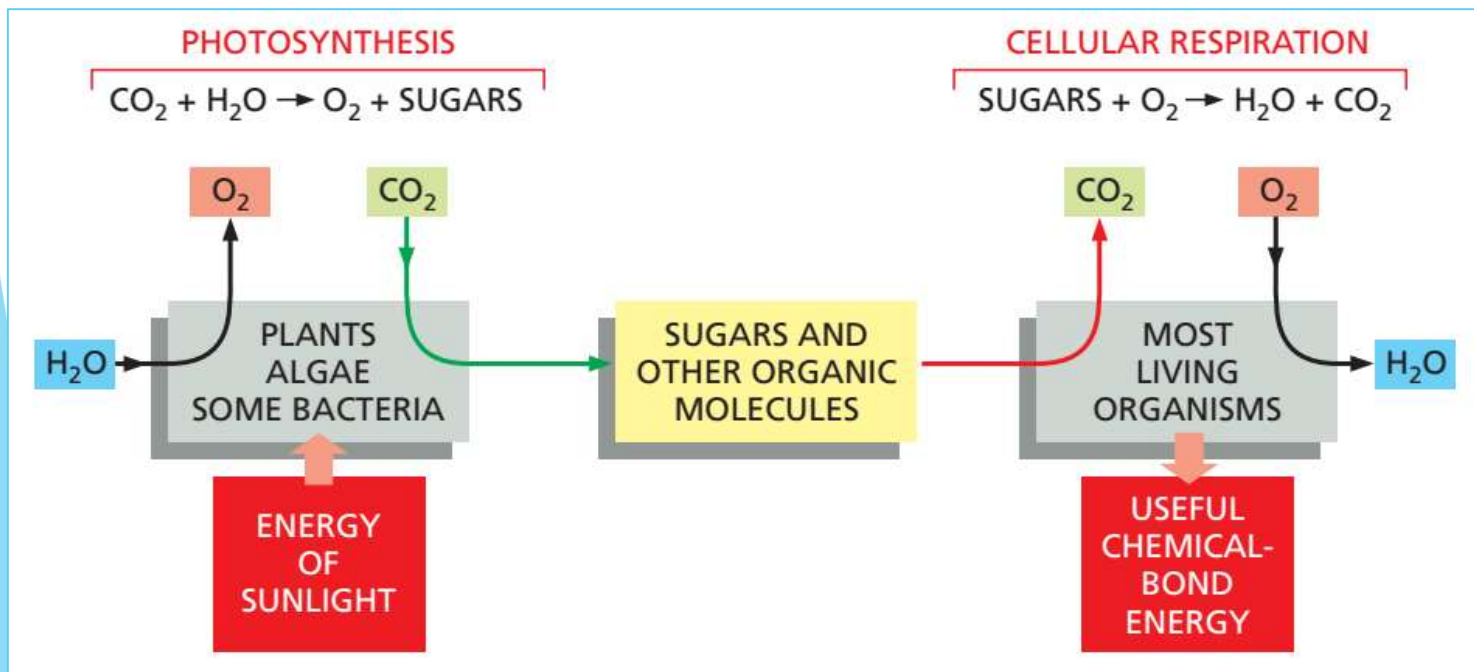
- NADH a NADPH jsou důležité elektronové nosiče.



- Oxidace a redukce zahrnují přenos elektronů.

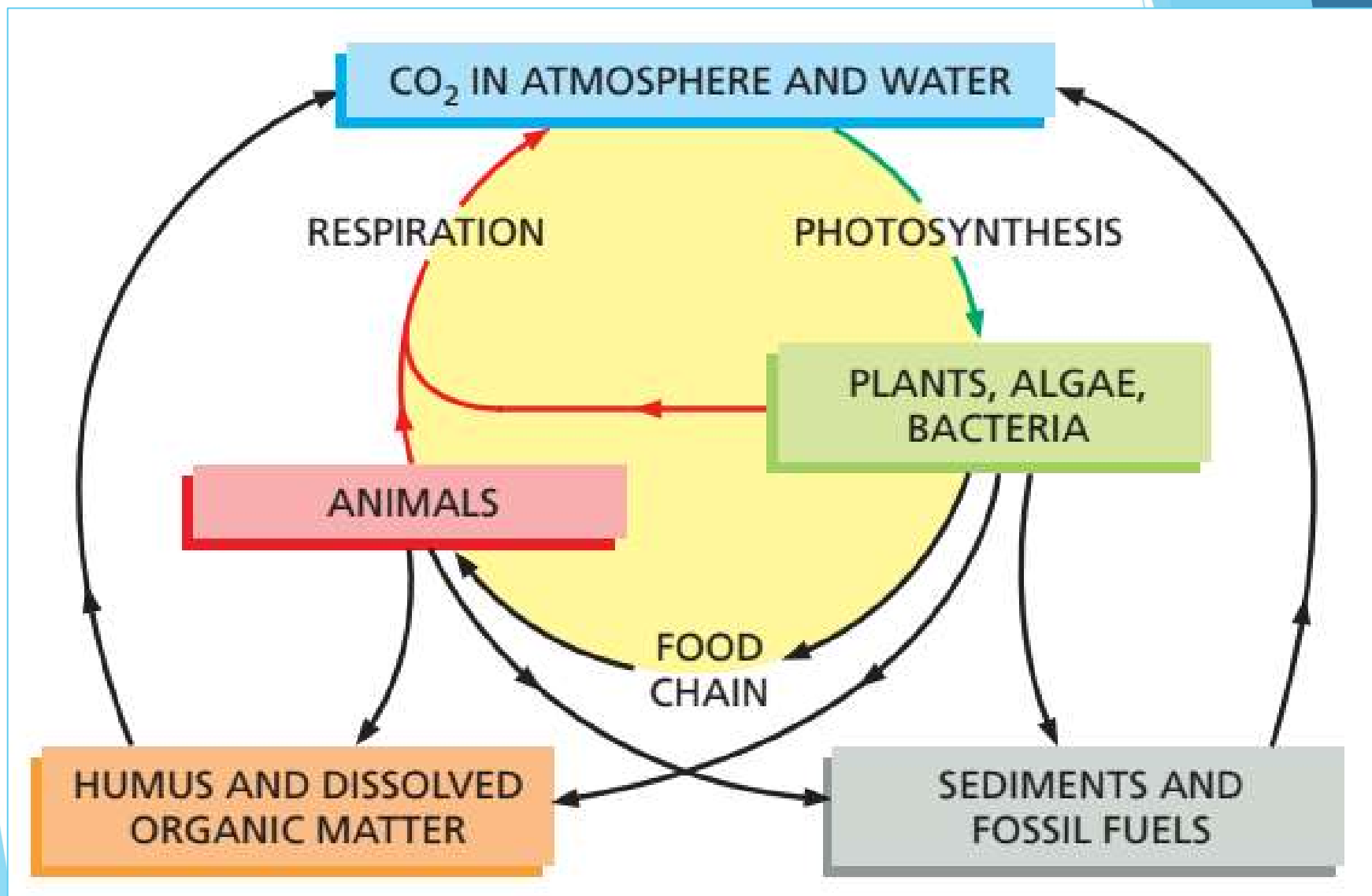
# Bioenergetika fotosyntézy

- ▶ Chloroplasty se specializují na přeměnu energie záření na chemickou energii:
  - ▶ volná molekulární energie některých fotosyntetických procesů
  - ▶ fotosyntéza zahrnuje absorpci světla, či energie fotonu světla ( $\Delta E$ , J) danou jeho frekvencí ( $\nu$ ,  $s^{-1}$ ) nebo vlnovou délkou ( $\lambda$ , in m) a rychlostí světla ( $c$ );  $h$  je Planckova konstanta
  - ▶  $\Delta E = h\nu = hc/\lambda$ , navrženo Max Planckem v 1900

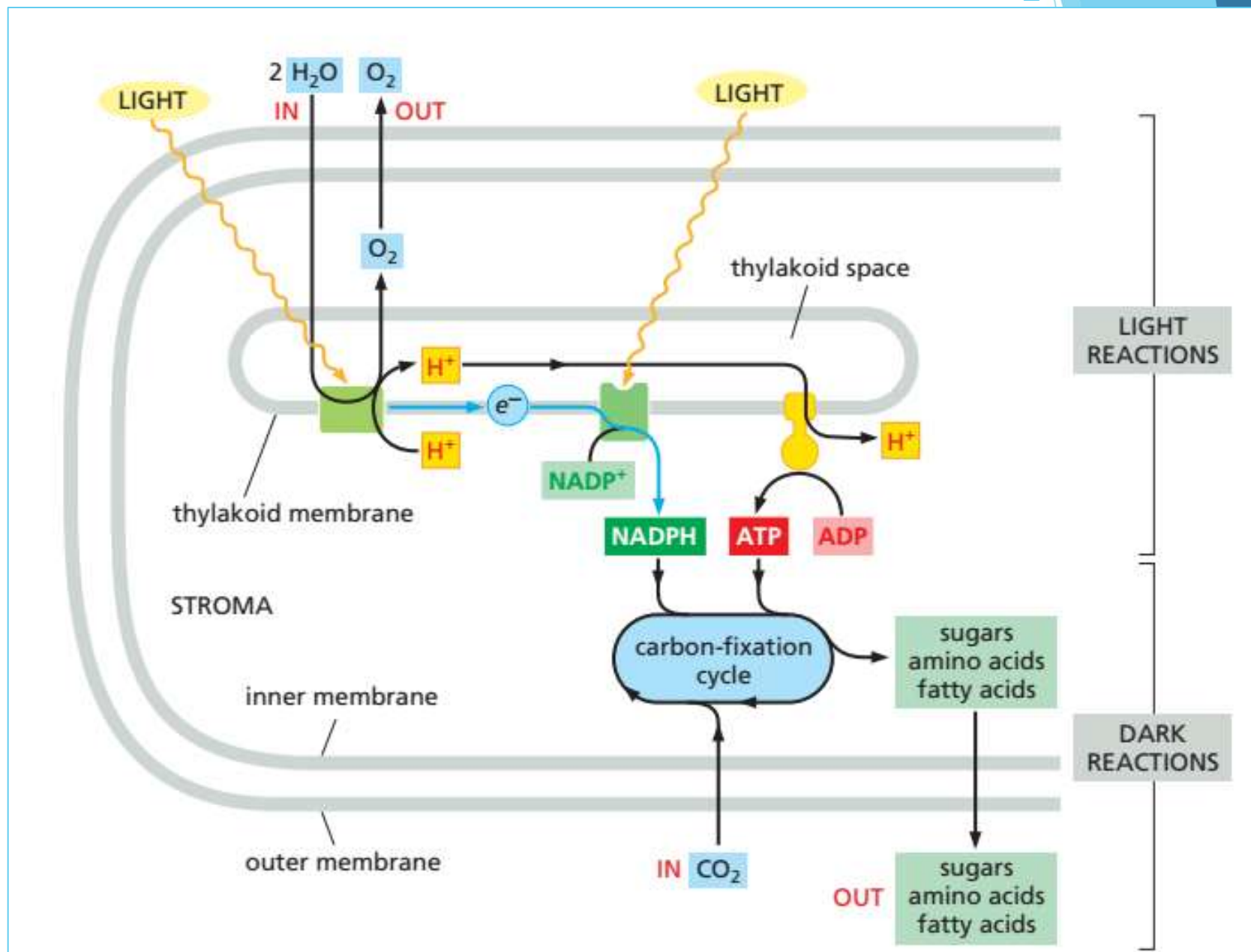


*Fotosyntéza a respirace jsou navzájem se doplňující procesy v živém světě.*

## Uhlíkový cyklus (*the carbon cycle*)

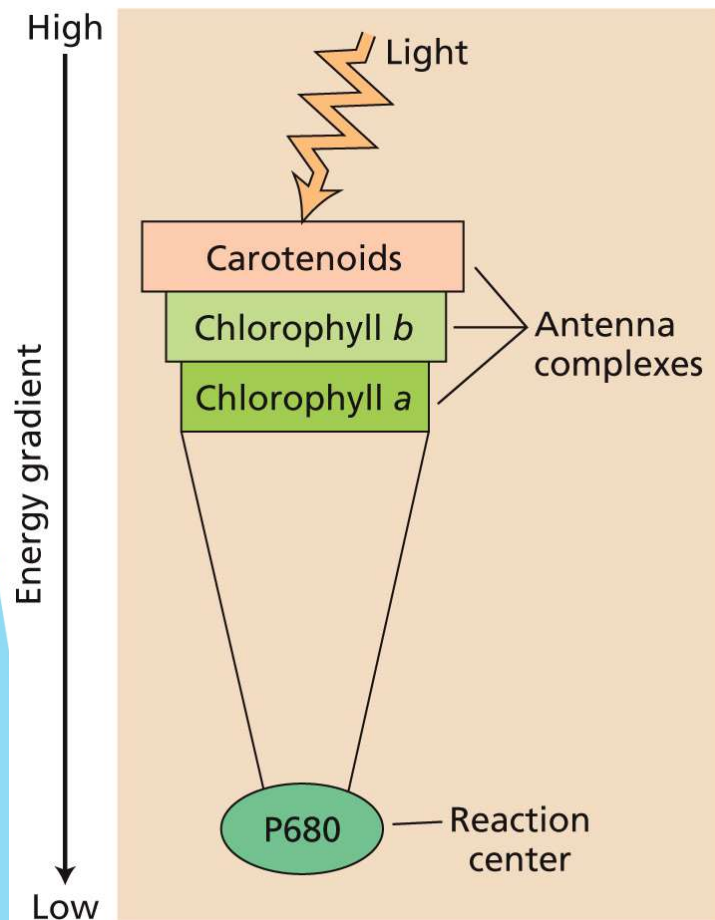


# Fixace C využívá ATP a NADPH na přeměnu CO<sub>2</sub> na cukry

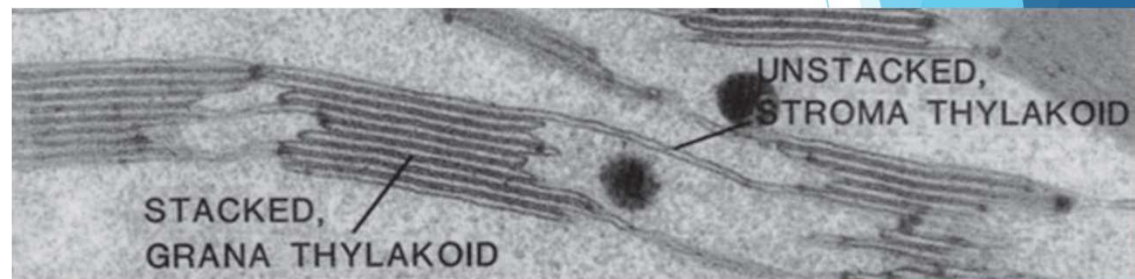


# Světelné reakce fotosyntézy

- ▶ Probíhají na thylakoidech, což je specializovaný membránový systém, který obsahuje protein-pigmentové komplexy, **fotosystémy (PS)**:
  - ▶ komplexy sbírajícími světlo (light-harvesting antennas, LHC) (pigments)
  - ▶ fotochemická reakční centra PS I a PS II absorbují světlo



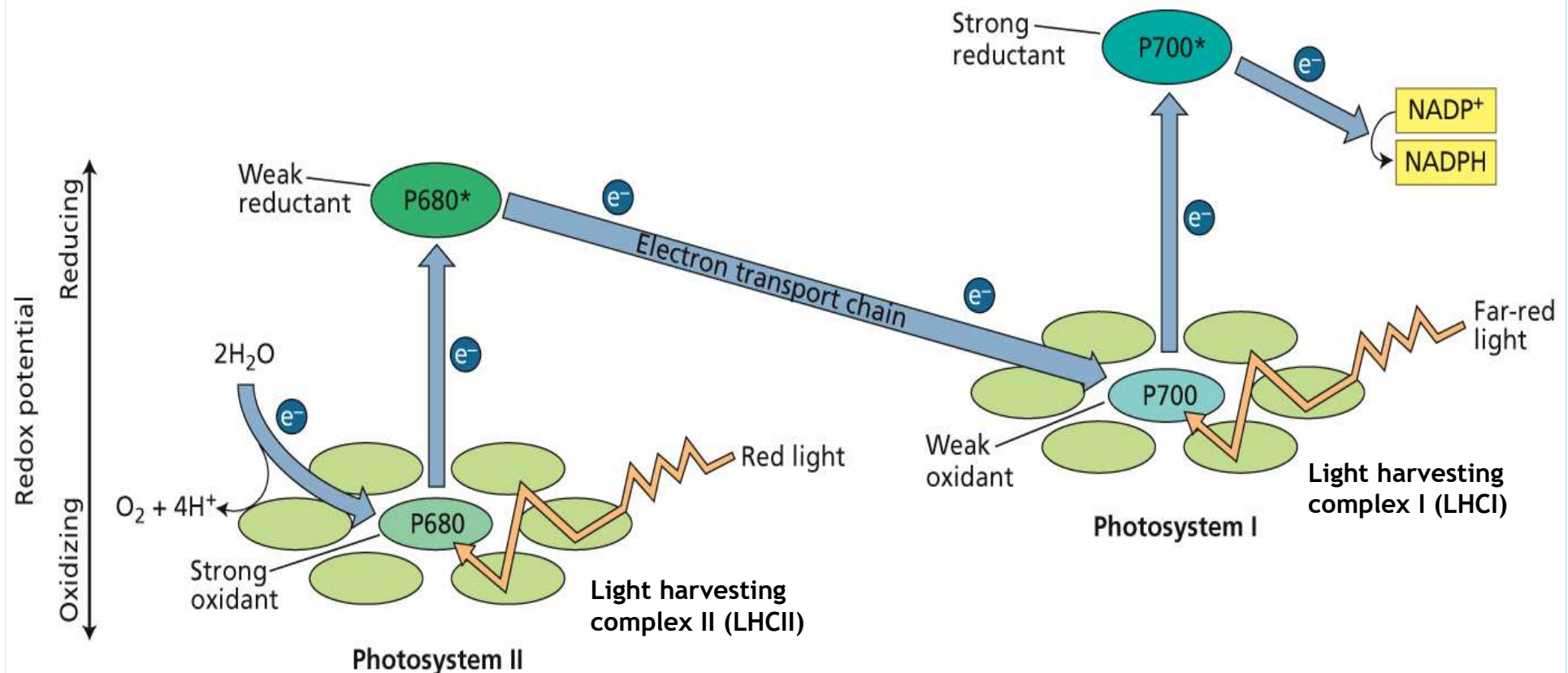
**Grana lamellae** (stacked, PSII) a **stroma lamellae** (not stacked, PSI)



- ▶ Přesun excitační energie z anténního systému (LHC) směrem k reakčnímu centru pomocí *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) v příznivém energetickém gradientu.
- ▶  $\beta$ -karoteny fungují jako antioxidanty, chrání fotosystémy před poškozením.

## Z (zig-zag) schéma fotosyntézy rostlin

- ▶ 2 fotosystémy (integrální membránové komplexy, 10 nm) fungují v sérii.
- ▶ **Photosystem II (P680):** reakční centrum obsahuje chlorofyl a absorbuje *red light* (max 680 nm), antény a komplex oxidující vodu (donor  $e^-$ ).
- ▶ **Photosystem I (P700):** reakční centrum obsahuje chlorofyl a absorbuje *far-red light* ( $> 680$  nm), antény a komplex redukuje  $\text{NADP}^+$ .





# Mechanismus elektronového transportu

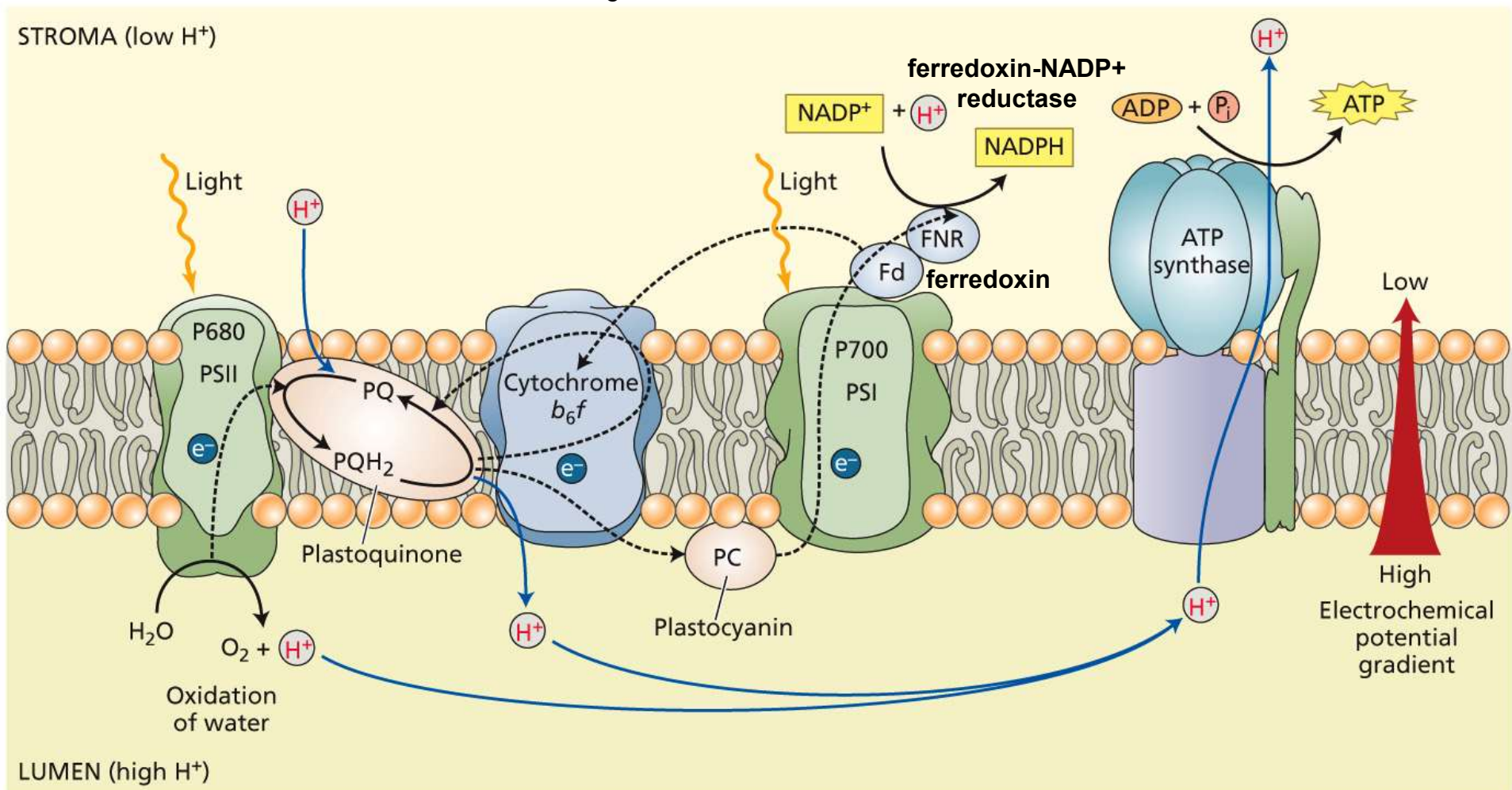
- ▶ Energie je zachycena, když excitovaný chlorofyl redukuje molekulu akceptoru
  - ▶ Každé 4 fotony zachycené PS II produkují  $O_2$ :  $2H_2O + 8h\nu \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$
- ▶ Přenos  $e^-$  a  $H^+$  v thylakoidní membráně je prováděn čtyřmi proteinovými komplexy :

**PSII**

**Cytochrome  $b_6f$**

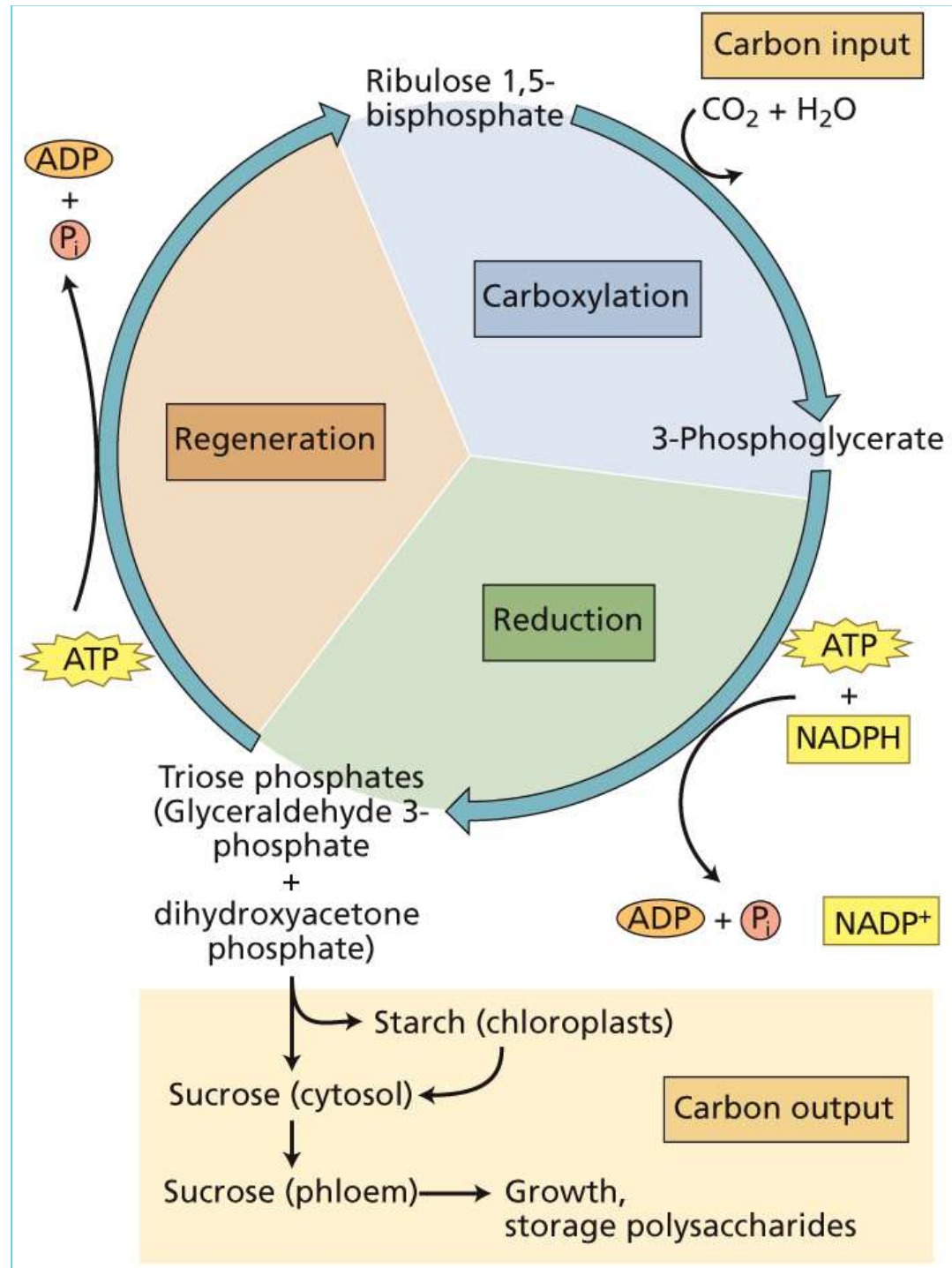
**PSI**

**ATP synthase**



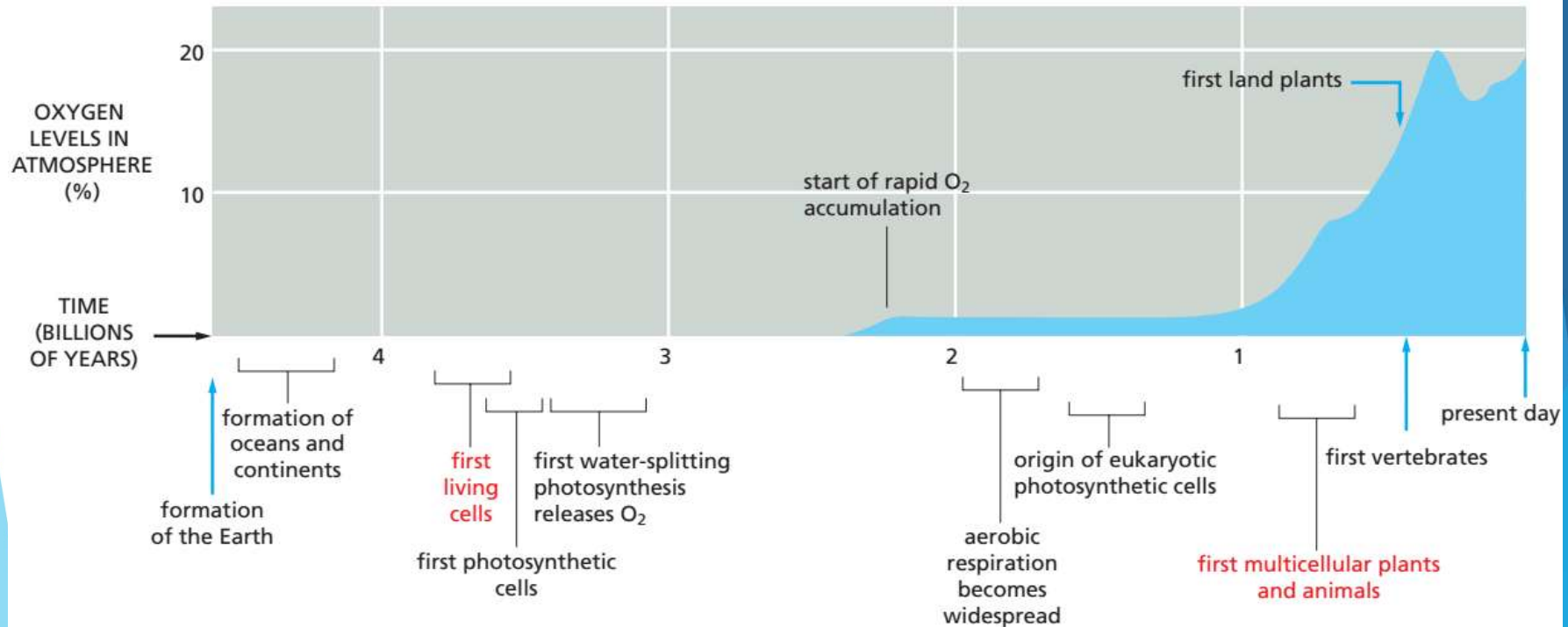
# Fotosyntéza: uhlíkové reakce

- ▶ Asimilace anorganického uhlíku do organického materiálu (*autotrophy*).
- ▶ Calvin-Benson cyklus probíhá ve 3 fázích:
  - ▶ karboxylace
  - ▶ redukce
  - ▶ regenerace
- ▶ Ve stromatu chloroplastů.
- ▶ U všech rostlin a mnoha prokaryot...



## Fixace uhlíku (CO<sub>2</sub>)

- ▶ Melvin Calvin použil <sup>14</sup>C s nově vyvinutou technikou papírové chromatografie k identifikaci prvních produktů fotosyntézy v roce 1947 (*the Calvin cycle*)
- ▶ Fixace CO<sub>2</sub> do cukru vyžaduje 3 ATP a 2 NADPH podle následující reakce:
- ▶  $2\text{H}^+ + \text{CO}_2 + 3\text{ATP} + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{NADPH} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + 3\text{P}_i + 3\text{ADP} + 2\text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
- ▶ **Glukóza** je vysoce reaktivní redukující cukr a ve vysokých koncentracích by byla pro buňku nebezpečná (jako cukrovka rostlin).
  - ▶ Glukóza tedy buď nevzniká během fotosyntézy, nebo se okamžitě přemění na neredukující cukry (např. sacharózu, rafinózu), cukerné alkoholy (např. sorbitol) nebo škrob.
- ▶ **Rubisco** (ribulózabisfosfátkarboxyláza/oxygenáza)

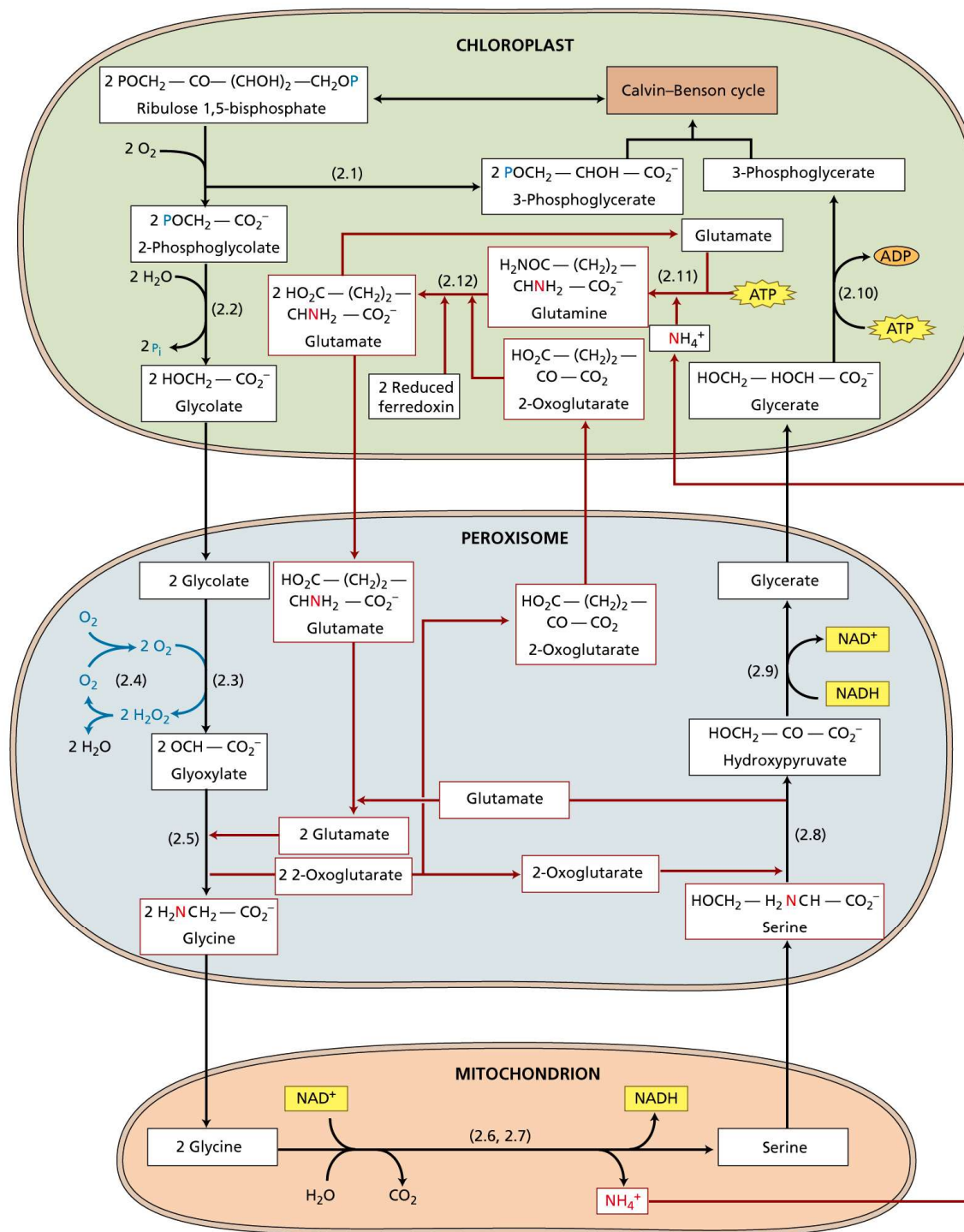


## Fixace uhlíku (CO<sub>2</sub>)

- ▶ Melvin Calvin použil <sup>14</sup>C s nově vyvinutou technikou papírové chromatografie k identifikaci prvních produktů fotosyntézy v roce 1947 (*the Calvin cycle*)
- ▶ Fixace CO<sub>2</sub> do cukru vyžaduje 3 ATP a 2 NADPH podle následující reakce:
- ▶  $2\text{H}^+ + \text{CO}_2 + 3\text{ATP} + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{NADPH} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + 3\text{P}_i + 3\text{ADP} + 2\text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
- ▶ **Glukóza** je vysoce reaktivní redukující cukr a ve vysokých koncentracích by byla pro buňku nebezpečná (jako cukrovka rostlin).
  - ▶ Glukóza tedy buď nevzniká během fotosyntézy, nebo se okamžitě přemění na neredukující cukry (např. sacharózu, rafinózu), cukerné alkoholy (např. sorbitol) nebo škrob.
- ▶ **Rubisco** (ribulózabisfosfátkarboxyláza/oxygenáza)
- ▶ katalyzuje vazbu CO<sub>2</sub> na ribulóza-1,5-bisfosfát,
  - ▶ extrémně pomalý enzym, ale hojný (25%-75% listového a 50 % chloroplastových proteinů)
  - ▶ **nejhojnější protein na Zemi!!!**
  - ▶ velká podjednotka Rubisca kódovaná chloroplastovým genomem, malá jaderným genomem
  - ▶ Jedním z důvodů neefektivnosti **Rubisco** je, že dosáhlo svého současného stavu evoluce předtím, než rostliny vnesly O<sub>2</sub> do prostředí; vzhledem k současným atmosférickým koncentracím je O<sub>2</sub> velmi účinným konkurentem pro vazebné místo CO<sub>2</sub>
- ▶ Pokud Rubisco oxiduje ribulóza-1,5-bisfosfát místo její karboxylace, ztracený C je částečně znovu zachycen ve **fotospirační dráze**.
- ▶ Některé rostliny si vyvinuly mechanismy, jak koncentrovat CO<sub>2</sub> kolem Rubisca.
  - ▶ Fixují CO<sub>2</sub> **fosfoenolpyruvát (PEP) karboxylázou**, enzymem, který je necitlivý na O<sub>2</sub>.

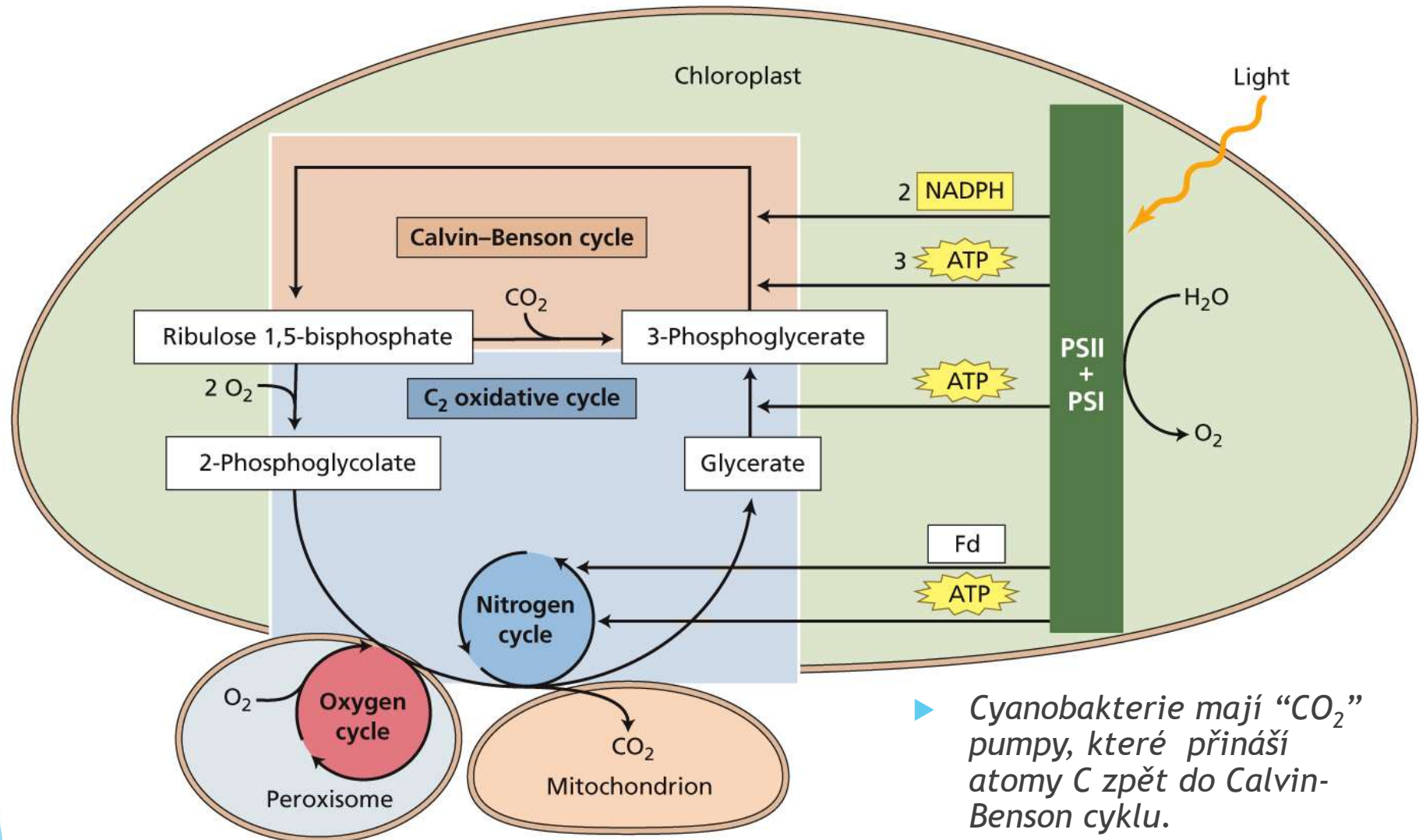
# Fotorespirace: C<sub>2</sub> oxidativní fotosyntetický cyklus uhlíku

- ▶ Minimalizuje ztráty způsobené oxidázovou aktivitou RUBISCA.
  - ▶ *CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> si konkurují v reakcích katalyzovaných RUBISCEM!!!*
- ▶ Síť koordinovaných enzymatických reakcí přesouvající atomy C, O, N v organelách:
  - ▶ chloroplastech
  - ▶ peroxisomech
  - ▶ mitochondriích
- ▶ Interaguje se s mnoha metabolickými cestami.



## Závislost fotorespirace na metabolismu chloroplastů

- ▶ Kinetické vlastnosti Rubisca, teplota a koncentrace atmosférického  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$  kontrolují rovnováhu mezi Calvin-Benson cyklem a  $\text{C}_2$  oxidačním cyklem.
- ▶  $\text{C}_2$  oxidační cyklus je spojen s fotosyntetickým transportem elektronů.



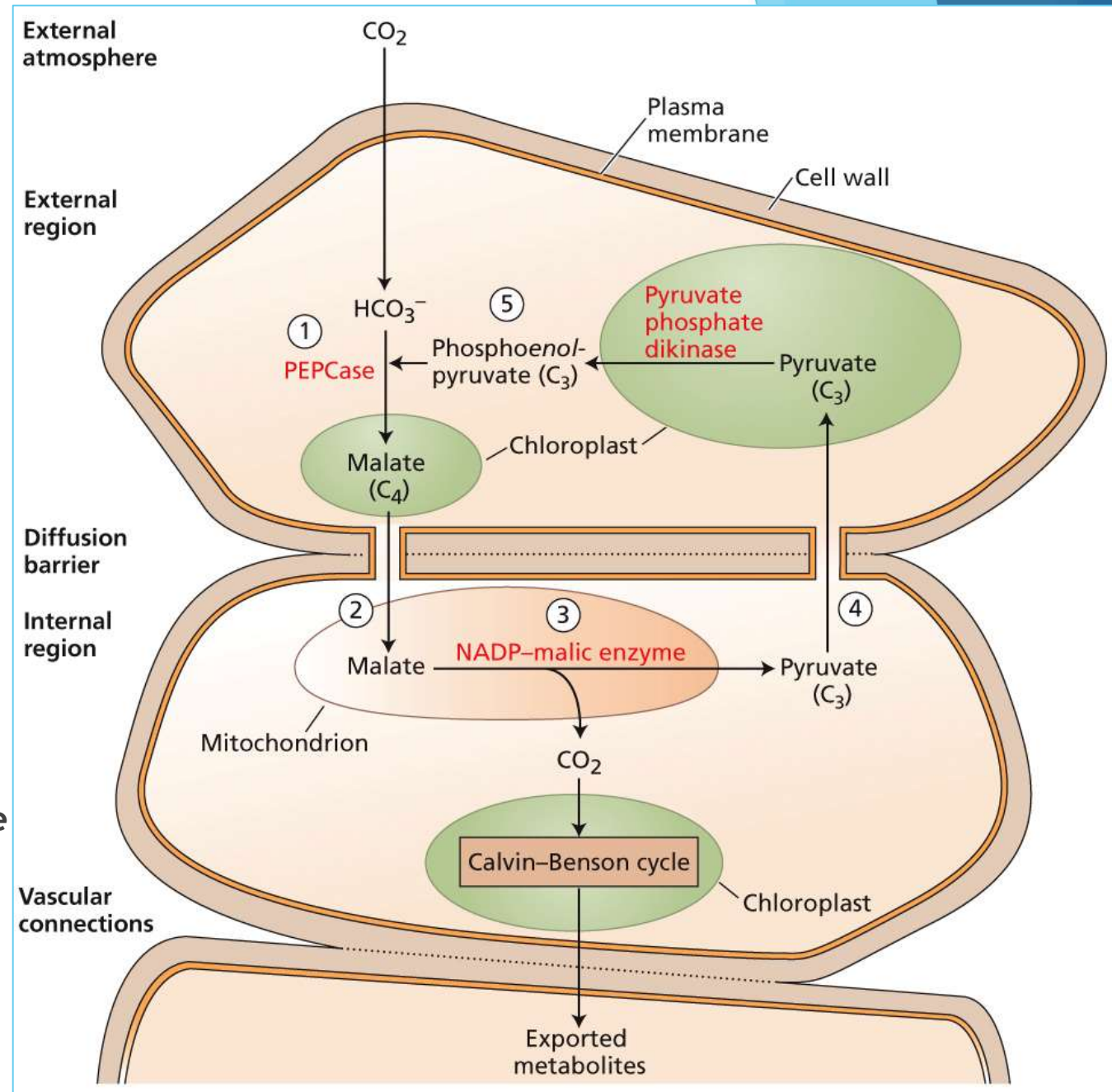
- ▶ *Cyanobakterie mají "CO<sub>2</sub>" pumpy, které přináší atomy C zpět do Calvin-Benson cyklu.*

# Fotorespirace

- ▶ *a light-dependent respiratory pathway in plants*
- ▶ dýchací cesta u rostlin závislá na světle...
- ▶ Zahrnuje zachycení kyseliny glykolové produkované v chloroplastu z kyseliny 2-fosfoglykolové vytvořené, když Rubisco katalyzuje přidání kyslíku místo oxidu uhličitého do ribulosa bisfosfátu.
- ▶ „Warburgův efekt“, což je zjevná inhibice fotosyntézy kyslíkem objevená Otto Warburgem (1920).
- ▶ V zelených listech se enzymy podílející se na fotorespiraci nacházejí v peroxisomech v těsné blízkosti chloroplastů a mitochondrií (viz obr.)
- ▶ Potvrzení fotorespirace bylo prvním použitím *Arabidopsis* jako modelového systému (experimenty prováděné na fotorespiračních mutantech, kterým chybí normální enzymy).
- ▶ *Fotorespirační cesta je cílem pro zlepšení plodin pro zvýšení výnosu a biomasy.*
- ▶ Fotorespirační dráha je obvykle považována za plýtvavou, nicméně je prospěšná při podpoře asimilace dusičnanů a při snižování fotoinhibice fotosystému II.

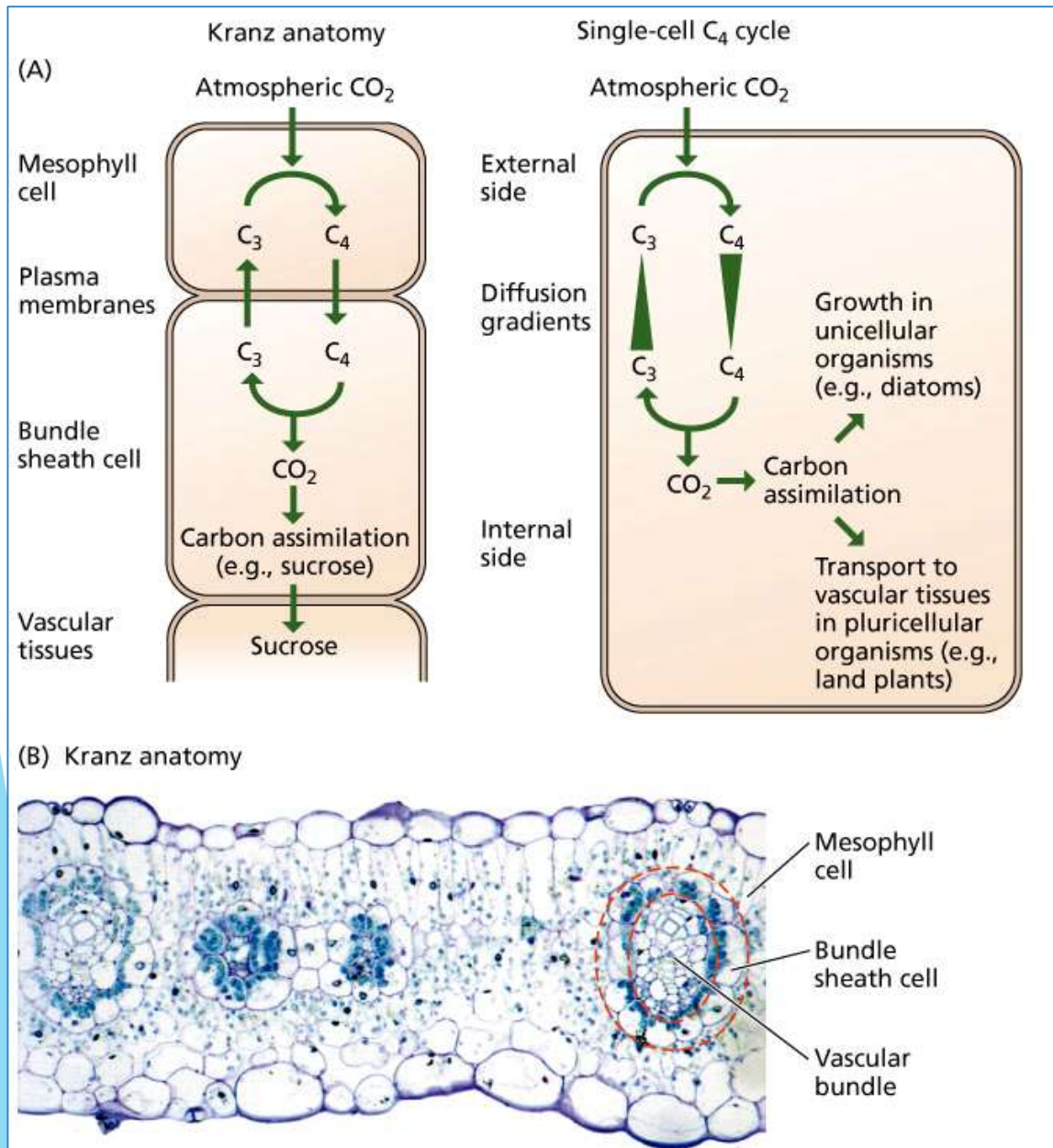
# C<sub>4</sub> cyklus: mechanismus koncentrace inorganického uhlíku

- ▶ C<sub>4</sub> photosynthesis
- ▶ Malát a aspartát jsou primární produkty karboxylace.
- ▶ Zahrnuje pět po sobě jdoucích fází.
- ▶ Ve dvou rozdílných kompartmentech:
  - ▶ 1. PEP-carboxylase (PEPCase) fixuje CO<sub>2</sub>
  - ▶ 2. C<sub>4</sub> produkty uvolňují CO<sub>2</sub> pro fixaci Rubiscem





# Speciální anatomie C4 rostlin

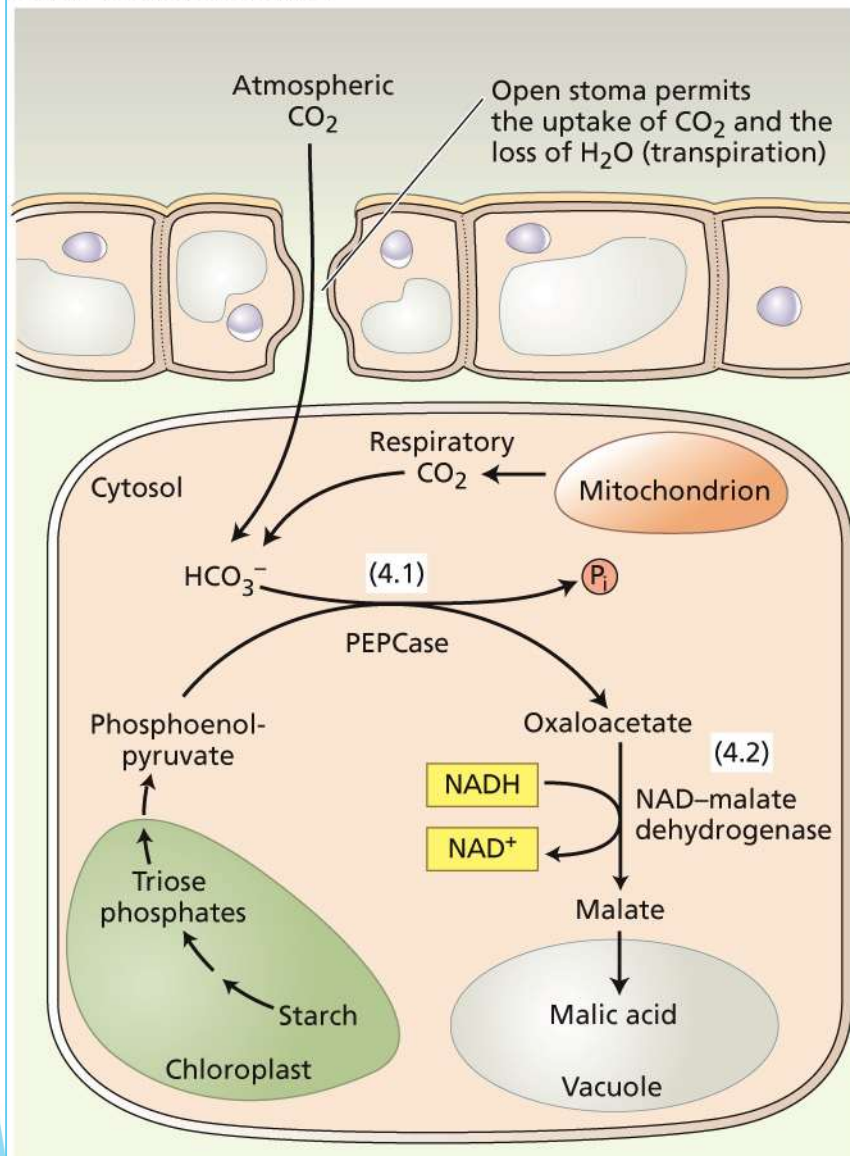


- ▶ Většina C<sub>4</sub> rostlin obsahuje mezofylové buňky s enzymy zapojenými do C<sub>4</sub> dráhy a buňky pochev cévního svazku obsahují enzymy zapojené do C<sub>3</sub> dráhy.
- ▶ Mezi těmito 2 buněčnými typy existuje mnoho plasmodesmat pro usnadnění přesunu 3-C a 4-C kyselin.
- ▶ V některých rostlinách se však fotosyntetická dráha C<sub>4</sub> vyskytuje v jediné buňce.
- ▶ „C<sub>4</sub> rice project“
- ▶ *Fixace CO<sub>2</sub> jednobuněčnými řasami se používá jako ekologický způsob odstraňování CO<sub>2</sub>.*

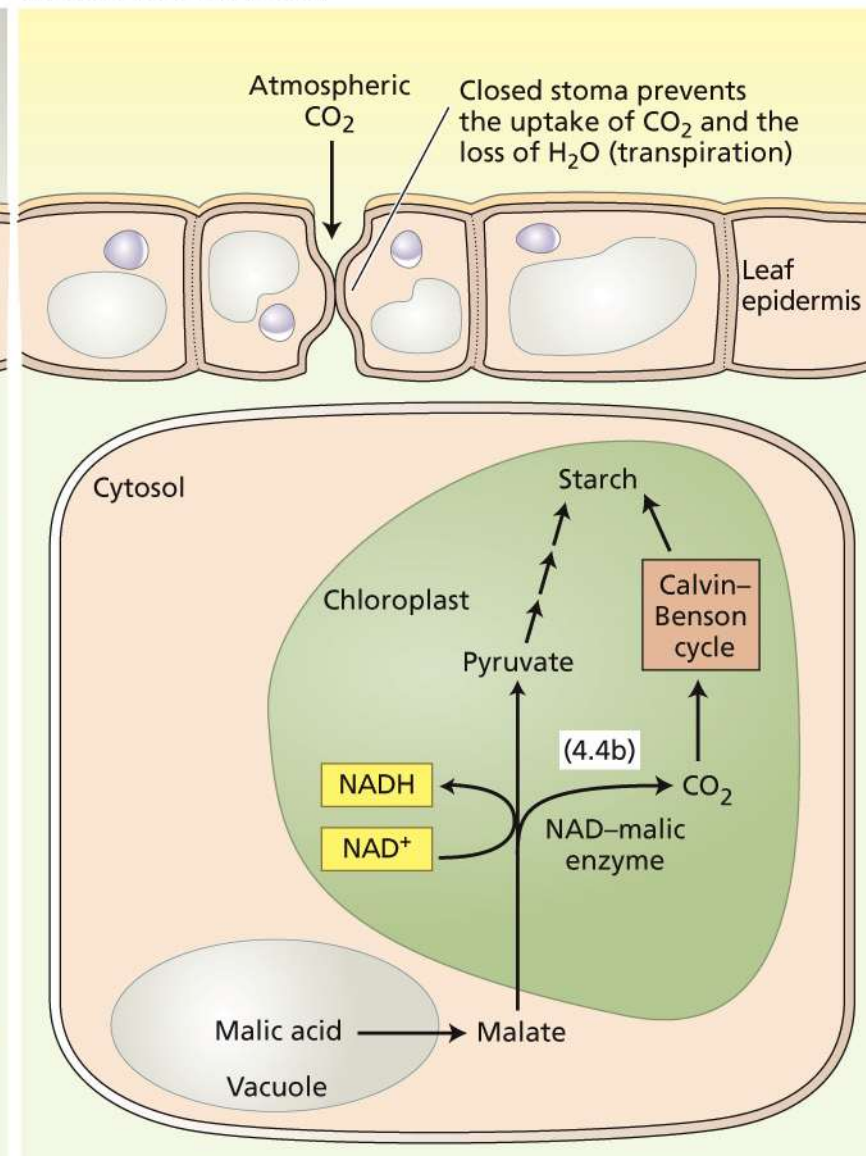
# CAM: mechanismus koncentrace inorganického C

- ▶ Crassulacean acid metabolism ~ všestranný, citlivý, v suchém prostředí

Dark: Stomata opened



Light: Stomata closed

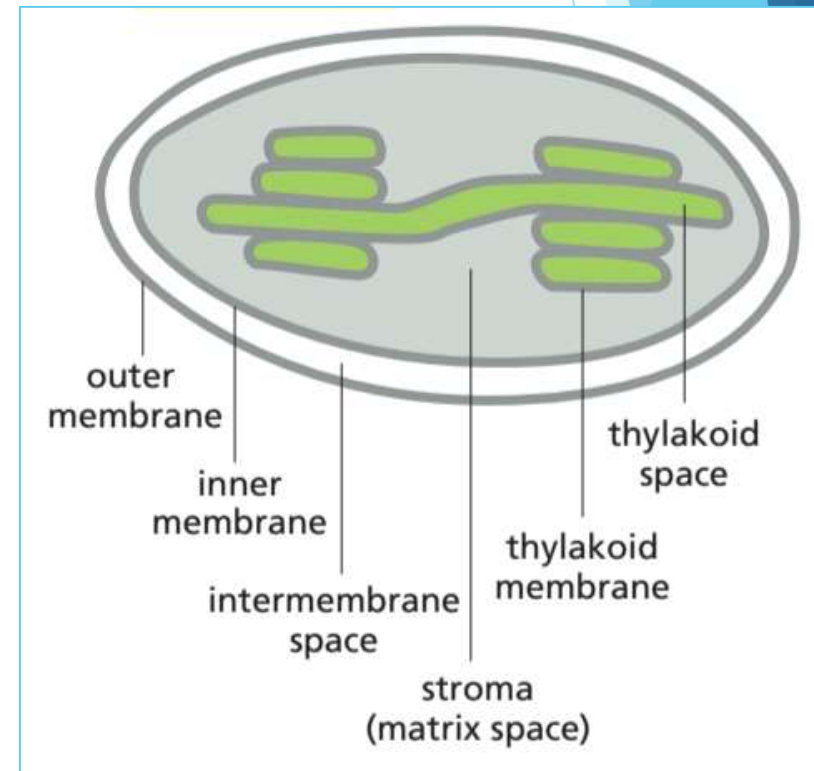


## Genetický systém plastidů

- ▶ Chloroplastová DNA je typicky **kruhovitá**, složená z  $12-18 \times 10^5$  párů bází, které kódují přibližně 50-200 genů, volně uložená ve stromatu.
  - ▶ Hans Ris (1961) objevil DNA podobnou prokaryotické, ale spojenou s proteiny.
- ▶ **Kompletní sekvence** chloroplastových genomů z *Arabidopsis* a dalších.
  - ▶ Chloroplastové geny obsahují promotorové sekvence a lze je modifikovat.
- ▶ Plastidová DNA kóduje geny, které jsou segregovány nemendelovským způsobem, ***mateřskou dědičností*** (*maternal inheritance*).
- ▶ Chloroplasty obsahují vlastní DNA a RNA polymerázy, DNA gyrázu, mechanismy opravy DNA a proteiny podobné histonům.
- ▶ Plastidový genom **nekóduje všechny potřebné proteiny!**
  - ▶ Např. velká podjednotka Rubisca je kódovaná chloroplastovým genomem, malá jaderným genomem.
  - ▶ Geny, kódující chloroplastové proteiny, mohly být přeneseny z původního endosymbionta (který dal vzniknout chloroplastu) do jádra.
- ▶ Stroma i tylakoidy obsahují **70S ribozomy** (prokaryotické!).
- ▶ **Import proteinů** přeložených na cytosolických ribozomech do chloroplastů.

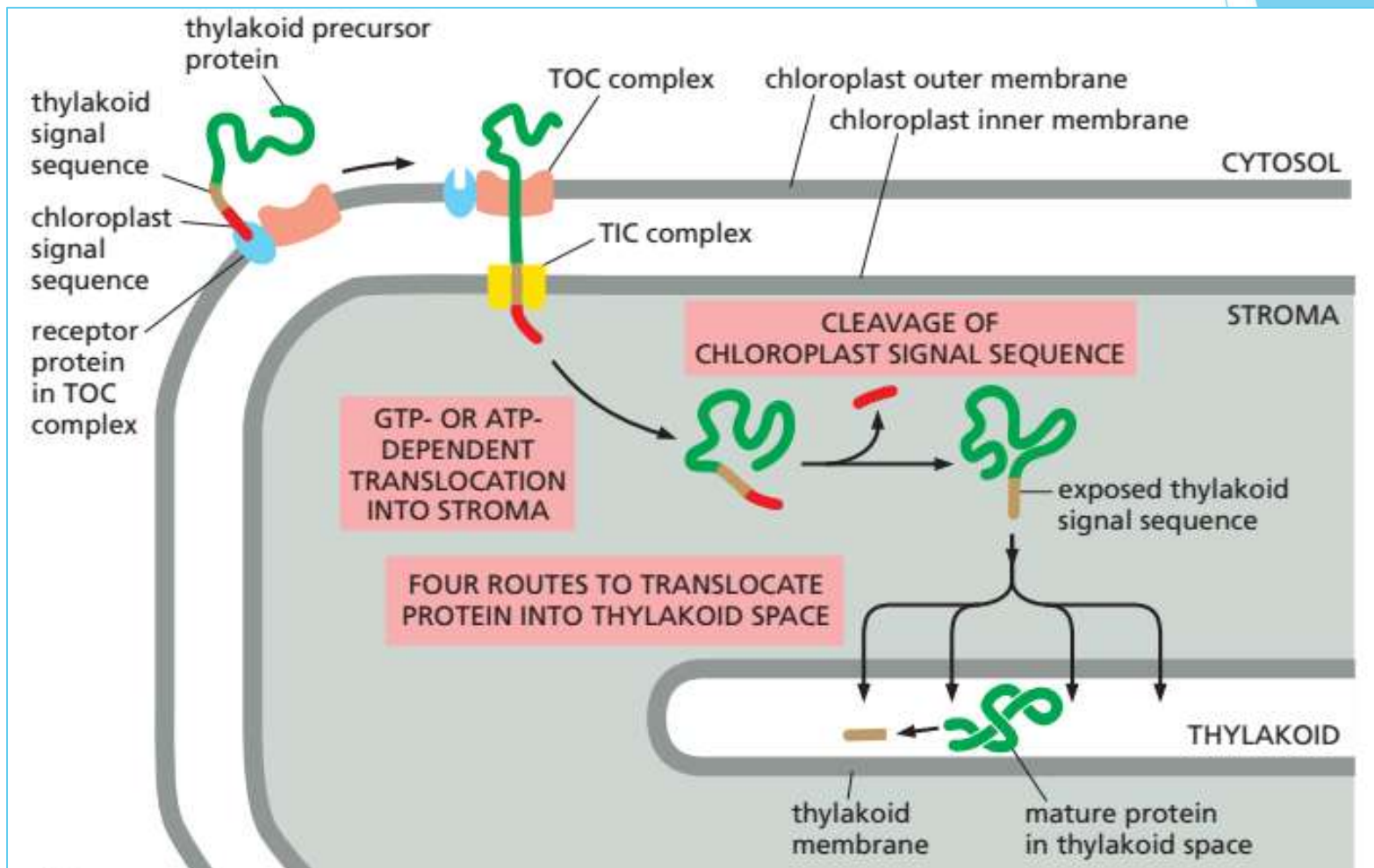
## Transport proteinů do chloroplastů

- ▶ Transport probíhá *post-translačně*, využívá samostatné translokační komplexy v každé membráně a vyžaduje energii.
  - ▶ Např. **Tic-Toc translokon** v chloroplastovém obalu
- ▶ Chloroplasty mají elektrochemický gradient  $H^+$  na své tylakoidní membráně, ale ne na své vnitřní membráně, a využívají hydrolýzy GTP a ATP.
  - ▶ Např. ATP je nutný pro působení chaperoninů, které poskytují hybnou sílu pro translokaci proteinu přes dvojitou membránu do stromatu.
- ▶ Importované polypeptidy zacílené do lumenu tylakoidů musí procházet obalem a tylakoidní membránou a musí mít 2 signální sekvence, typicky na N-konci:
  - ▶ **chloroplastová signální sekvence**
  - ▶ **tylakoidní signální sekvence**



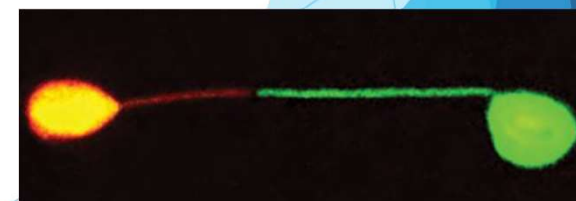
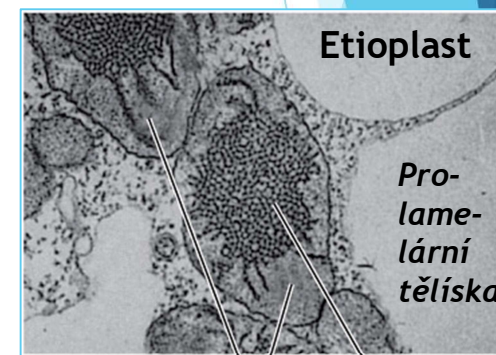
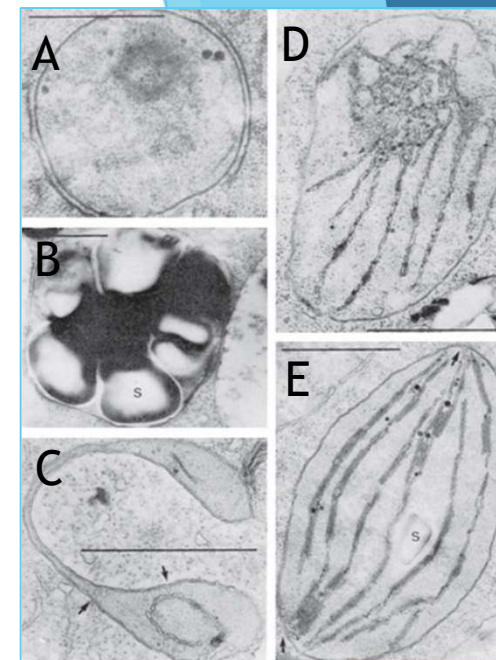
## Tic-Toc translokátorový komplex

- ▶ Lokalizován na kontaktních místech vnitřní a vnější chloroplastové membrány.
- ▶ Prvním krokem je vazba proteinu na složku Toc, import je regulován fosforylací.
- ▶ Po vstupu polypeptidu do stromatu, je tranzitní peptid odštěpen proteázou.



# Biogeneze plastidů

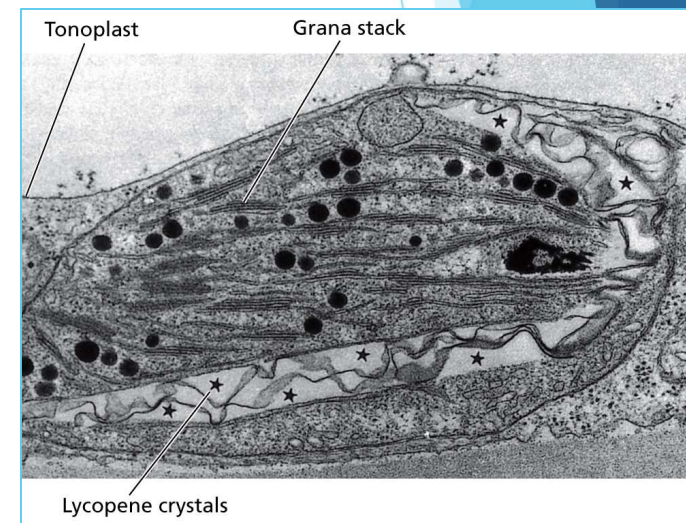
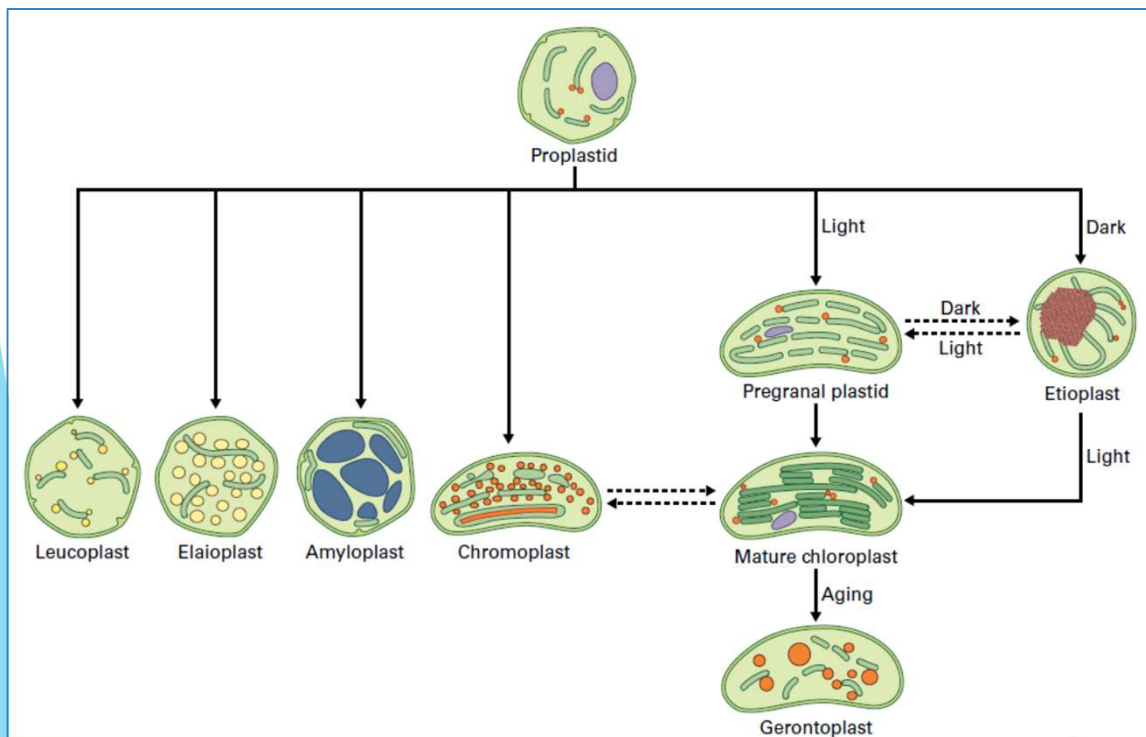
- ▶ Chloroplasty (a mitochondrie) vynikají dělením nezávisle na dělení jádra, ale vyžadují proteiny kódované v jádře.
- ▶ Meristematické buňky obsahují **proplastidy**, kulovité organely (A, eoplasty) neobsahují téměř žádné vnitřní membrány a pouze malé množství DNA, RNA, ribozomů a rozpustných proteinů; žádný chlorofyl a potřebné enzymy.
- ▶ Eoplast přechází do fáze amyoplastu (B), kde akumuluje škrob. Poté prochází améboidním stádiem (C) a vstupuje do pregranální fáze (D). Na světle se vyvinou chloroplasty (E).
- ▶ Pokud jsou uchovávány ve tmě, vyvinou se v **etioplasty**:
  - ▶ menší než chloroplasty
  - ▶ obsahují semikrystalická *prolamelární tělíska* místo membrán a *protochlorofyl* (žlutozelený prekurzor)
  - ▶ Pokud jsou vystaveny světlu, mohou vytvářet grana.
- ▶ Existují tenké tubulární spoje a tubulární rozšíření mezi plastidy (*stromatubules* nebo *stromules*), kterými se mezi nimi mohou pohybovat proteiny (?).
- ▶ Chloroplasty zanikají stárnutím jako *gerontoplasty*.
  - ▶ V důsledku poškození UV zářením, stresem mohou být degradovány a recyklovány v procesu *chlorofágie*.



Dva fluorescenčně označené chloroplasty a stromule.

## Ostatní plastidy

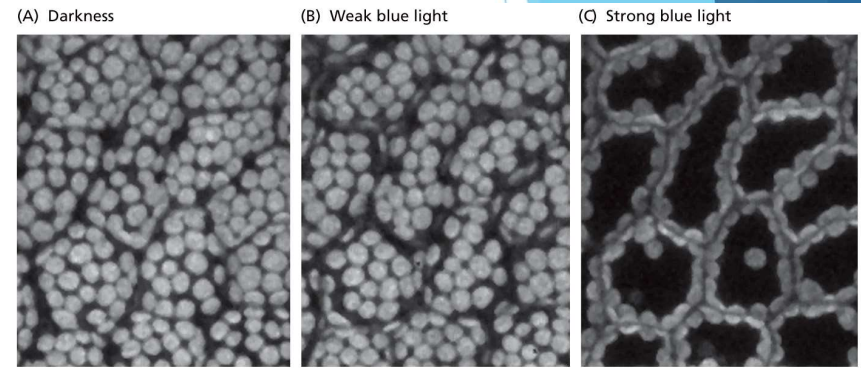
- ▶ Všechny plastidy jsou tvořeny z proplastidů a obvykle mají stejný genom.
- ▶ Proplastidy dozrávají ve specializované plastidy v různých rostlinných pletivech.
- ▶ **Chromoplasty** ~ plastidy v mnoha květech a plodech postrádají chlorofyl, ale hromadí obrovské množství karotenoidních pigmentů (přitahují hmyz) chloroplasty lze přeměnit na chromoplasty (žluté listy na podzim, dozrávající ovoce).
- ▶ **Leukoplasty** ~ nepigmentované plastidy v nefotosyntetických tkáních zůstávají čiré a fungují při ukládání makromolekul, včetně proteinů (*proteinoplasty*), lipidů (*elaioplasty*) nebo škrobu (*amyloplasty*); v nektaru (silný zápach).



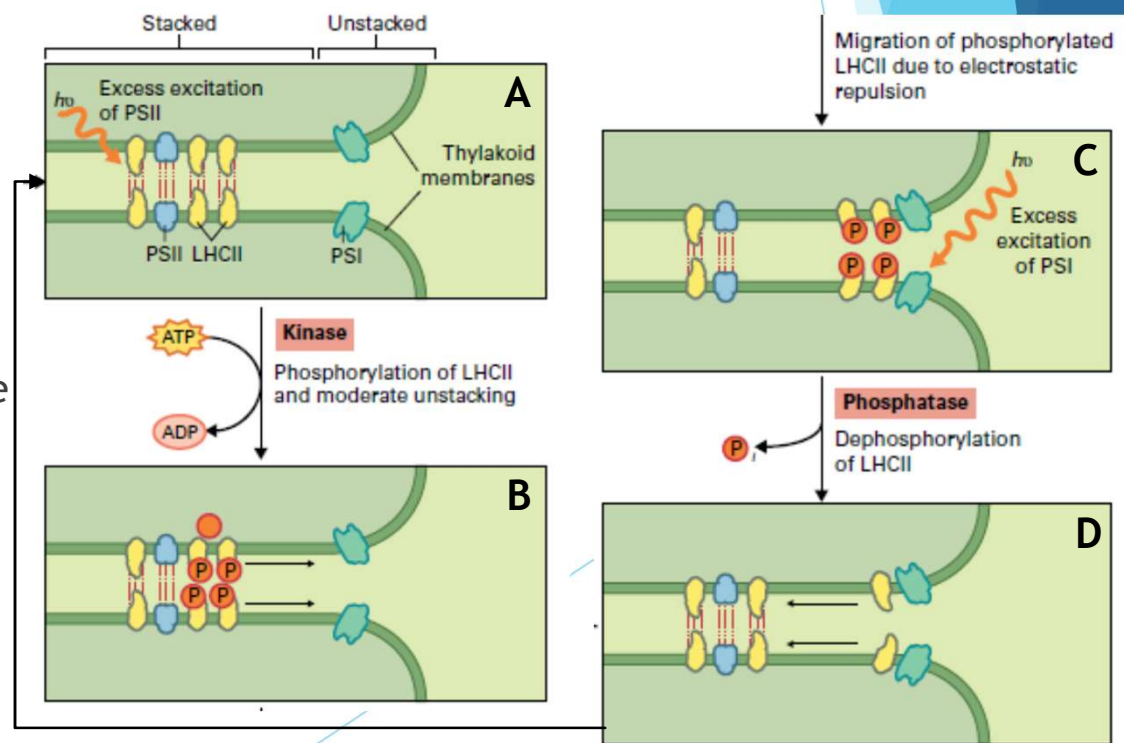
- ▶ *Chloroplast mění se na chromoplast v plodu rajčete.*

# Fyziologické, biochemické a strukturní adaptace

- ▶ Rostliny musí vyvážit škodlivé účinky světla (*photodamage*) s prospěšnými účinky světla fotosyntézou; *intracelulární fototaktické pohyby*.
- ▶ Pohyb chloroplastů ~ aktomyosinový systém
  - ▶ chloroplasty rostlin se neustále přesouvají,
  - ▶ např. do zaostřeného světla v epidermis
- ▶ Adaptace na změny v kvalitě světla.
  - ▶ (stín větší podíl tmavě červeného světla)



- ▶ Snaha vyrovnat distribuci energie mezi PSI a PSII a max. účinnost fotosyntézy.
- ▶ Umožněno fosforylací a pohybem LHCII.
- ▶ Na plném slunci (vysoká aktivita PSII) je LHCII fosforylován, migruje do nenaskládaných oblastí tylakoidu a předá svou energii PSI.
- ▶ Absorpce příliš velkého množství světla může vést k *fotoinhibici*!





# Redukce dusičnanů a aktivace sulfátů v chloroplastech

- ▶ Snadno dostupná energie v chloroplastu z něj dělá ideální místo pro redukci jiných molekul kromě  $\text{CO}_2$
- ▶ Rostliny přijímají sulfát z půdy, tato inertní forma síry musí být buňkou aktivována pomocí **ATP sulfurylázy** za vzniku adenosinfosulfátu (APS) a pyrofosfátu, poté může být přenesena do mnoha molekul. např. syntéza methioninu.
- ▶ Dusičnany přijímané rostlinami musí být redukovány, než mohou být metabolizovány.
  - ▶ dvoustupňový proces: redukce dusičnanů na dusitany poté redukce dusitanů na amoniak
  - ▶ první krok probíhá v cytosolu, druhá v plastidech

