

B 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, a to především jako podklad k vysvětlení procesů na vyšších organizačních úrovních (orgány, celé rostliny). Fyziologie rostlin však nejenže využívá biochemické poznatky, ale má vypracované i vlastní metodické přístupy, jak studovat metabolické projevy rostlin nedestruktivně, *in vivo*. Právě k těmto přístupům a také ke vztahům mezi metabolismem a ostatními funkcemi rostliny bude směřovat následující část našeho učebního textu. Nemůžeme ovšem zcela vypustit přehled základních poznatků o metabolických procesech získaných klasickými metodami na buněčné úrovni. Předpokladem k hlubšímu pochopení dalšího výkladu je nutná jistá úroveň znalostí z organické chemie a biochemie, získaná v příslušných přednáškách a učebnicích (např. Kindl et Wöber 1981, Karlson 1981, Vodrážka 1992, 1993, Šípal et al. 1992).

5 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 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 nejen k redukci anorganických sloučenin uhlíku, ale i k jiným biochemickým reakcím, např. k redukci sloučenin dusíku a síry.

Fotosyntetická asimilace oxidu uhličitého zahrnuje velké množství dílčích reakcí, které lze rozdělit do tří skupin:

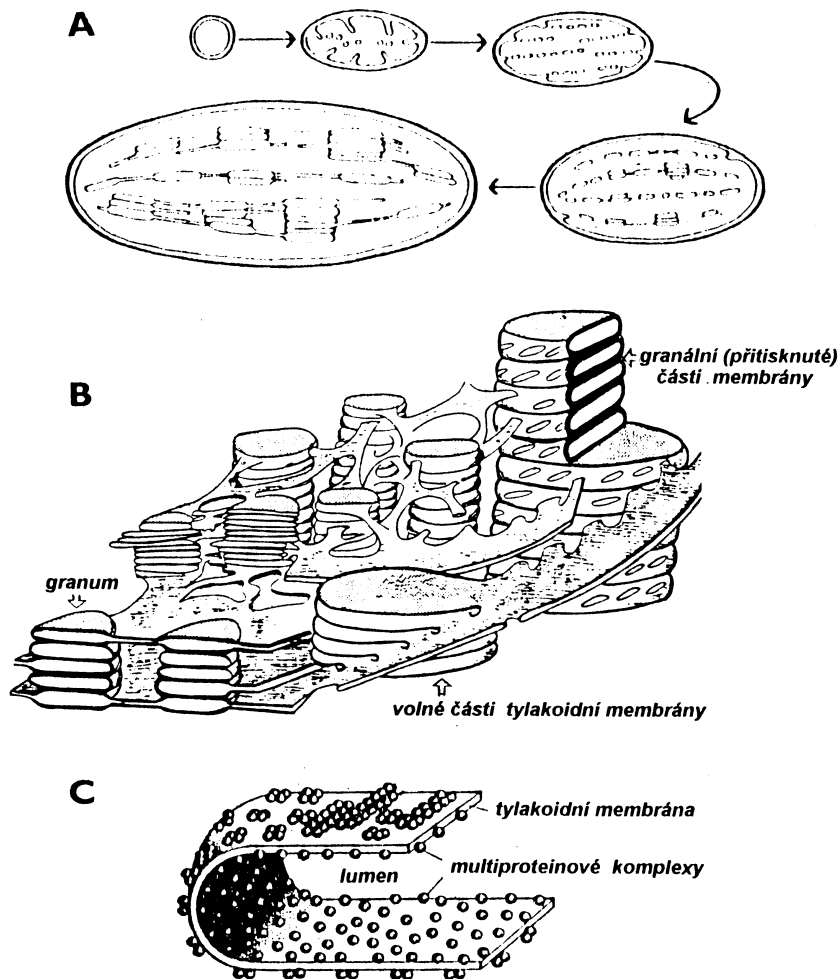
- a) **fyzikální procesy** související s absorpcí záření v asimilačních pigmentech a s rezonančním přenosem zachycené energie k reakčním centrům,
- b) **primární fotochemické a redoxní procesy** spojené s přenosem elektronů redoxními systémy k redukci NADP^+ (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a k energetické podpoře vzniku ATP (adenosintrifosfátu) z ADP (adenosindifosfátu),
- c) **sekundární biochemické reakce**, ve kterých dochází k vazbě CO_2 do organických sloučenin.

5.1 Stavba hlavních funkčních celků v tylakoidní membráně

Dokonalá souhra všech reakcí spojených s fotosyntézou je možná pouze ve specializovaných strukturách chloroplastů, které taky absorbují většinu záření dopadajícího na zelené orgány rostlin.

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 tylakoidů nazýváme **grana**. Ty části membrán, které k sobě v granech přiléhají nazýváme granální (přitisknuté, stěsnané) tylakoidní membrány. Mají poněkud odlišnou skladbu a funkci než ty, které volně komunikují se **stromatem** (= gelovitá výplň chloroplastu, bohatá na enzymy). Prostor uvnitř tylakoidů nazýváme **lumen** - je vyplněn vodou s rozpuštěnými solemi.



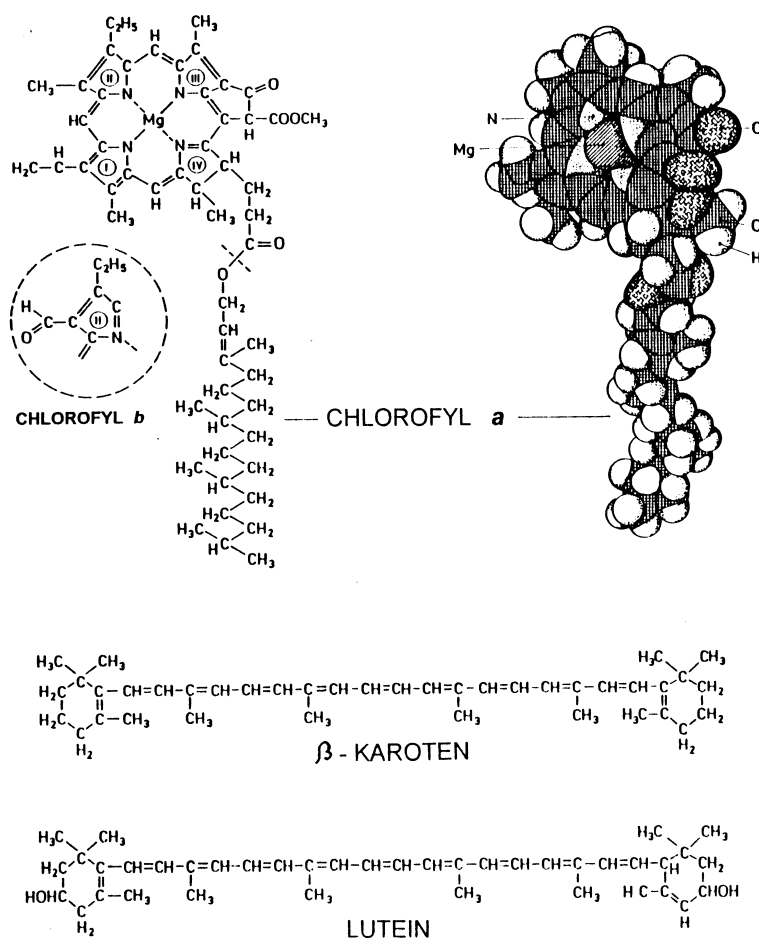
Obr.11. Schema vzniku tylakoidů z vnitřní membrány proplastidu (A), bližší pohled na část soustavy tylakoidů (B) a na výsek z jednoho tylakoidu (C).

Veškeré primární procesy fotosyntézy se odehrávají v thylakoidech, a to především v jejich membránách. Tyto membrány mají základní lipidovou matrix značně tekutou (s velkým obsahem nenasycených mastných kyselin). Zvláště pozoruhodný je vysoký obsah bílkovin - 60 až 65 % hmotnosti membrán. 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**. Naše představy o organizaci a funkci těchto celků se velmi rychle vyvíjejí. Nevíme dosud všechno, ale i to, co už víme,

zdaleka nelze zahrnout do našeho výkladu. Uvedme tedy jen velmi zjednodušený přehled těch nejpodstatnějších skutečností.

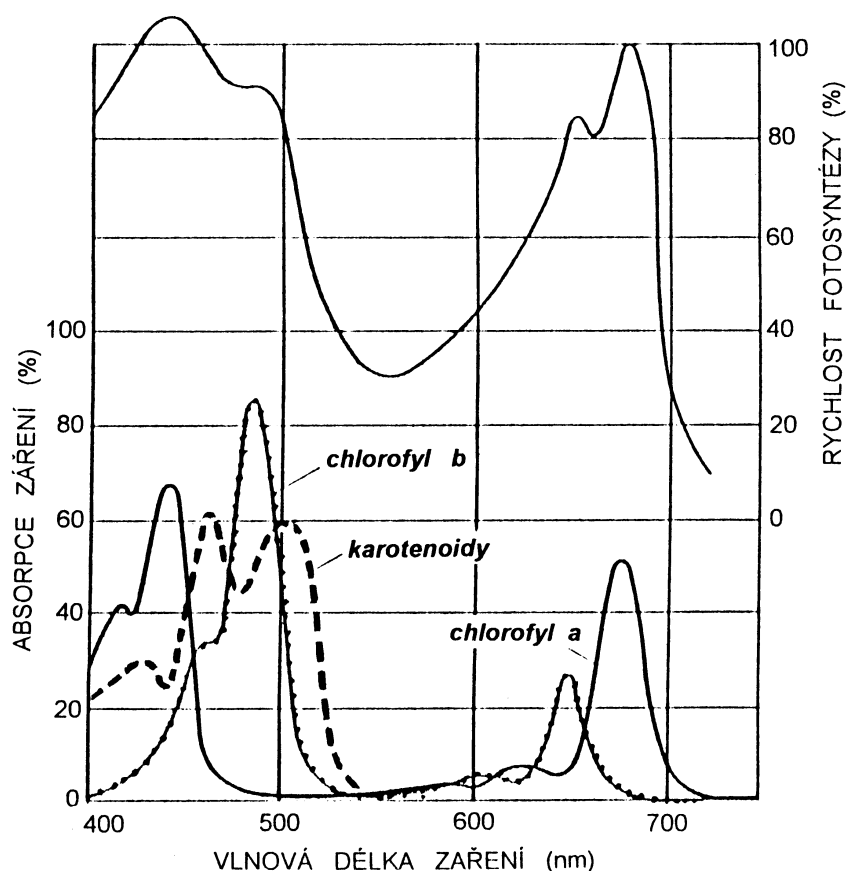
Oba typy fotosystémů (I a II) se skládají z centrální části (**reakční centrum, jádro fotosystému**), která je obklopena světlosběrným protein-pigmentovým komplexem, označovaným zkratkou **LHC** (= *Light Harvesting Complex*), nebo též jako **anténa**. Funkcí antény je pouze zachycovat a induktivní rezonancí předávat excitační energii 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.



Obr.12. Chemická stavba tří nejčastějších asimilačních pigmentů (Mohr et Schopfer 1978, upraveno).

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 (předat elektron) po příjmu energie fotonů. 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 tudíž jen přídatnou (akcesorickou) funkci, stejně jako karotenoidy. Pro fungování fotosyntetického aparátu není nezbytný. Chlorofyly jsou zelené, protože zelenou část viditelného spektra nejméně absorbují. Největší absorpci mají v oblasti modré (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). Nacházejí se 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 excitaci kyslíku. Vzniklý "singletový" kyslík, i některé další formy aktivovaného kyslíku, mají destruktivní účinky na stavební součásti thylakoidů (fotoinhibice fotosyntézy, blíže viz např. Long et Humpries 1994). Pokud je ale nadbytečná energie převedena ke karotenoidům, zneškodní se přeměnou na teplo. Karotenoidy jsou právě pro tuto funkci pro život rostlin naprosto nezbytné. Bezkarotenoidní mutanti působením světla velmi rychle hynou.



Obr.13. Poměrná pohltivost (absorbance) roztoků tří hlavních typů asimilačních pigmentů při různých vlnových délkách (absorpční spektra), a obvyklé akční spektrum fotosyntézy (relativní rychlost fotosyntézy při ozařování listu světlem různých vlnových délek, horní část grafu). Sestaveno podle různých autorů.

Oba typy fotosystémů mají kromě zmíněných společných znaků i řadu odlišností ve své stavbě a funkci. Existují i jisté rozdíly mezi druhy a navíc tentýž druh může složení fotosystémů poněkud měnit v závislosti na podmínkách prostředí. Niže uvedené charakteristiky mají proto značně pravděpodobnostní charakter.

Fotosystém I se nachází výlučně v těch částech thylakoidních membrán, které komunikují přímo se stromatem. Nevyskytuje se tedy v těch částech tylakoidů, 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). Pravděpodobně jde však o *dimer*, tedy o dvě spojené molekuly. Celkem je k proteinům reakčního centra připojeno ještě asi 50 až 130 dalších molekul chlorofylu *a*, spolu s několika molekulami karotenoidů. K proteinům reakčního centra je připojeno i několik přenašečů elektronů, jejichž identifikace není ještě dokončena. Anténní systém fotosystému I (světlosběrný komplex, LHC I) obsahuje asi 100 molekul chlorofylu *a* i *b* (v přibližném poměru 3:1 až 4:1), které jsou vázány na několik integrálních proteinů v těsné blízkosti reakčního centra.

Fotosystém II je lokalizován v granálních (přitisknutých, stěsnaných) membránách thylakoidů. Jeho hlavní část (bez vnější antény) je tvořena obvykle šesti integrálními a třemi periferními proteiny. Jádru (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 v jádře fotosystému trvale přítomno několik molekul přenašečů elektronů (feofytin, plastochinony Q1 a Q2).

K fotosystému II patří i komplex ve kterém dochází k **fotolýze vody**. Bývá též označován jako **OEC** (*Oxygen Evolving Center*). Je tvořen třemi periferními proteiny, připojenými z vnitřní strany (z lumen) tylakoidní membrány. Na nich jsou navázány 4 ionty manganu, dále ionty Cl^- a Ca^{2+} . K přenosu elektronů mezi komplexem oxidace vody a P680 slouží redoxní změny v molekule aminokyseliny tyrosinu.

Na proteiny v těsné blízkosti reakčního centra je 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 asi 100 až 250 molekul chlorofylů *a* i *b* v přibližně stejném poměru, a také menší množství karotenoidů. Pigmenty ve vnější anténě jsou také vázány na vhodné nosiče - bílkovinné molekuly (vždy asi 10 molekul chlorofylu, a 1 až 3 molekuly beta-karotenu na jeden polypeptid). Vnější antény nejsou pevně spojeny s ostatními částmi fotosystému, ale mohou se přemísťovat, což umožňuje přizpůsobit dodávku excitační energie měnícím se potřebám obou fotosystémů. Bylo dokázáno, že za vysokých hodnot záření dochází k přesunu vnějších antén od fotosystému II k fotosystému I, ve kterém je možný rychlejší transport elektronů. Fotosystém I je také odolnější k poškození přebytkem excitační energie. Přesun vnější antény vyžaduje dodávku metabolické energie (z hydrolýzy jedné molekuly ATP).

Cytochromový komplex (cyt *b₆* - cyt *f*) je složen ze čtyř proteinů. Tento komplex bývá přibližně rovnoměrně 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 nalzáme i v mitochondriích. Funkci má jednoznačnou, zprostředkovat tvorbu ATP z ADP při transportu protonů z lumen thylakoidu do stromatu.

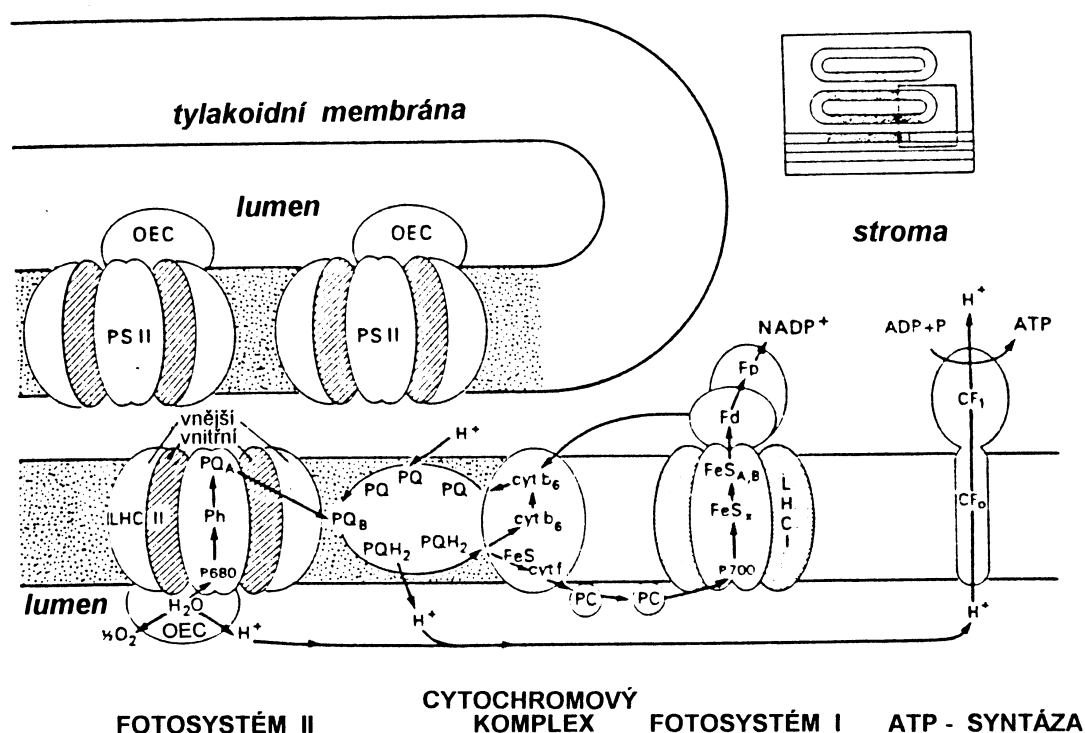
5.2 Průběh primárních procesů fotosyntézy

Při dopadu kvant záření (fotonů) vhodné vlnové délky (380 až 710 nm) na asimilační barviva v anténách, dojde v jejich molekulách k **excitaci elektronů**. Jeden foton přitom excituje pouze jeden elektron v jedné molekule. Excitační energie může být jednak přeměněna na teplo či vyzářena ve formě fluorescenčního záření, a nebo se může

induktivní rezonancí postupně předávat jiným molekulám barviv a tak nakonec proniknout až do reakčního centra k ionizovatelné molekule chlorofylu *a*. Jedině tato třetí možnost energetické přeměny záření je z hlediska dalšího využití významná a také obvykle převažuje.

Jednosměrnost přenosu excitační energie z antén směrem k reakčnímu centru fotosystémů je zajištěna díky rozdílům ve vlastnostech barviv, které jsou velmi závislé na způsobu jejich 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 delších 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*.

Předpokládejme, že se jedná o **centrum fotosystému II**. Z ionizovatelné molekuly chlorofylu P680 se po přijetí excitační energie odštěpí elektron a přechází na první akceptor, kterým je **feofytin**. Z něho je převeden na molekuly **plastochinonů Q_A a Q_B**, které jsou pevně vázány k proteinům D2 a D1. Fotosystém II pak elektrony opouští vázány na molekuly volně pohyblivých plastochinonů, kterých je v thylakoidní membráně vždy dostatečná zásoba. Redukcí se plastochinony mění na hydrochinony a směřují k cytochromovým komplexům.

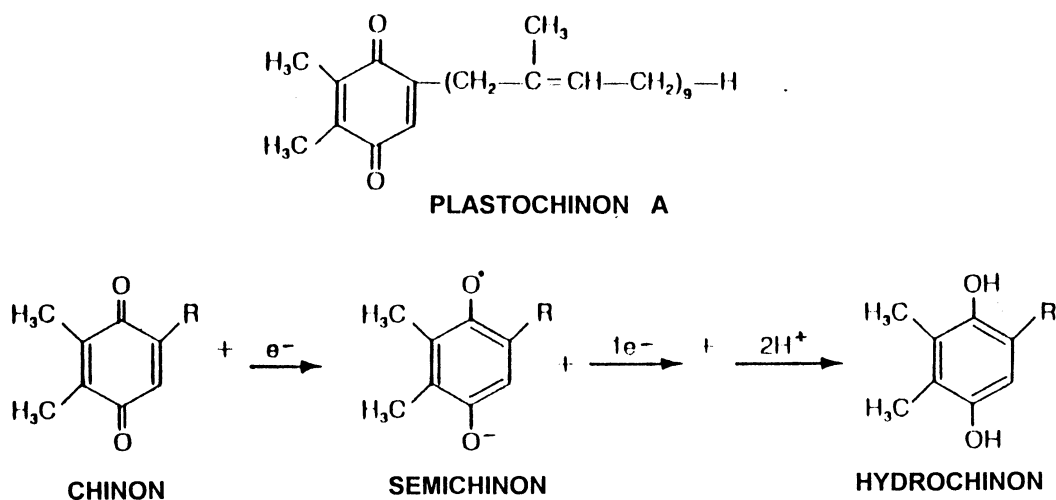


Obr.14. Zjednodušené schéma organizace hlavních proteinových komplexů a jejich spolupráce v průběhu primárních procesů fotosyntézy. LHC - světlosběrný komplex (anténa), OEC - komplex oxidace vody, PC - plastocyanin, PQ - plastochinon, Fd - ferredoxin (blíže viz text). Tečkovaná je vyznačena granální (přítisknutá, stěsnaná) část thylakoidní membrány.

Vraťme se však ještě k molekule chlorofylu P680, která předala svůj elektron. Zpět do původního stavu se dostává tím, že přijímá elektron pocházející z molekuly vody. **Oxidace 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, které tedy předávají čtyři elektrony. Je tedy zřejmé, že přímá oxidace vody molekulou chlorofylu (schopnou akceptovat jen jeden elektron) není možná. Podle našich současných představ by měla oxidaci vody zprostředkovat sloučenina se schopností čtyři elektrony naráz přijmout a pak je postupně předávat za asistence tyrosinu na P680. Je dosti pravděpodobné, že tuto úlohu plní mangan, který se může postupně oxidovat až na Mn^{4+} .

Sledujme však nyní opět cestu elektronů po vazbě na plastochinony. Je důležité si uvědomit, že k redukci plastochinonu na hydrochinon 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 (hydrochinonu na chinon) 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 tylakoidu obohatil o dva vodíkové ionty. To je velmi důležité pro celkový energetický výtěžek, jak uvidíme z dalšího výkladu.

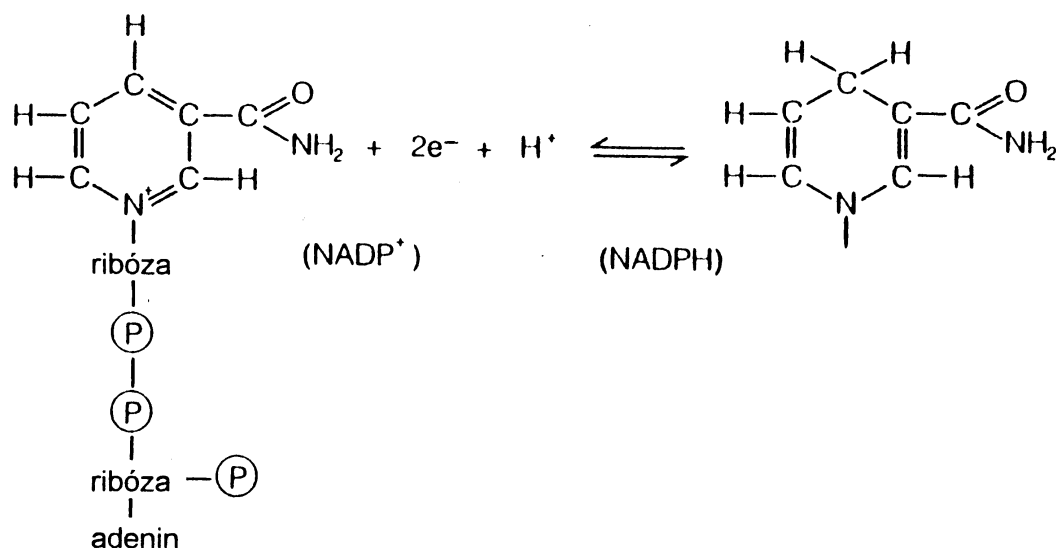


Obr.15. Struktura plastochinonu A a obecné schéma redukce plastochinonů.

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

Redoxní výměny v cytochromovém komplexu (se čtyřmi redoxními místy) končí u dalšího mobilního přenašeče elektronů na cestě z rozštěpené molekuly vody. Tímto přenašečem je **plastocyanin**, což je protein s malou molekulovou hmotností obsahující měď. Nachází se na vnitřní straně thylakoidní membrány (směrem k lumen). Přenáší elektrony z cytochromového komplexu do reakčního centra ve fotosystému I. Jakmile je světelným kvantem či rezonančním přenosem z antenních pigmentů oxidován **aktivní chlorofyl P700**, chybějící elektron je doplněn z plastocyaninu, neboť ve fotosystému I se neuplatňuje fotolýza vody jako zdroj elektronů. První akceptor elektronu z P700 je označován jako A_0 (jedná se o zvláštní molekulu chlorofylu a), pak následuje několik dalších přenašečů, jejichž strukturu dobře neznáme: A_1 (asi chinon) a tři Fe-S proteiny. Všechny jsou připojeny k integrálním proteinům reakčního centra. Teprve pak dochází k přenosu elektronu na **ferredoxin**, 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 flavoproteinem **ferredoxin-NADP reduktázou** (zkráceně Fp), a spotřebovávají se při ní dva elektrony.



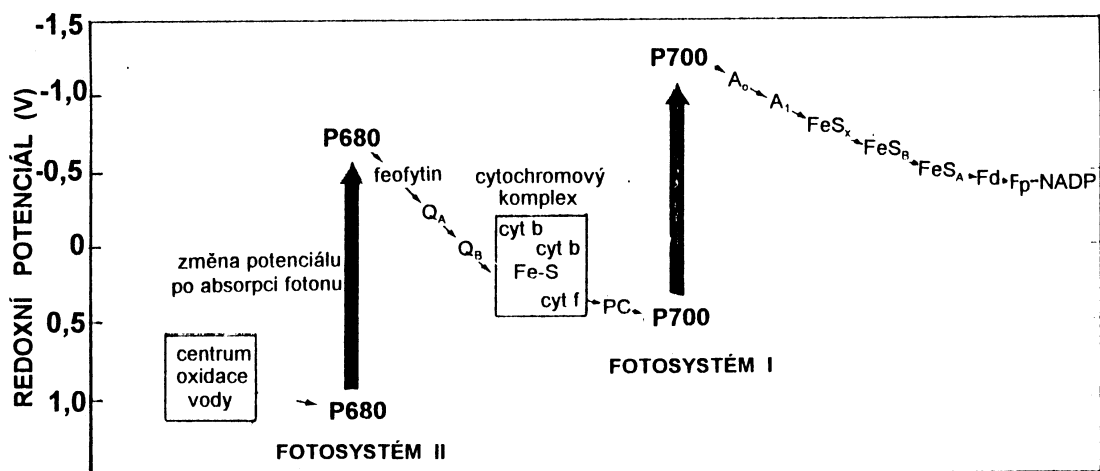
Obr.16. Závěrečná fáze necyklického transportu elektronů - redukce NADP^+ na NADPH.

Celý popsany přenos elektronů z rozštěpené molekuly vody až na NADP^+ nazýváme **necyklický elektronový transport**, neboť elektrony se již zpátky nevracejí. Kromě toho ještě může probíhat **cyklický elektronový transport**, který je mnohem kratší, není spojen s fotolýzou vody a nedává vznik NADPH. Při něm jsou elektrony uvolněné z P700 přenášeny přes přenašeče fotosystému I a mobilní ferredoxin nikoliv k NADP^+ , ale k cytochromovému centru, na kterém je zprostředkována redukce plastochinonu (2 elektrony + 2H^+ ze stromatu). Elektrony jsou dále přeneseny plastocyaninem k P700 a tím se jejich cyklus uzavírá. Dva protony však zůstávají v lumen. Je jasné, že tento cyklický transport elektronů slouží 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.

Za vysoké ozáření listů a současně za nedostatečné rychlosti biochemických redukčních procesů využívajících NADPH může dojít k nedostatku finálního akceptoru elektronů (NADP). V tom případě bývá část elektronů z ferredoxinu přenášena na kyslík za vzniku superoxidu (O_2^-). K inaktivaci tohoto nebezpečného produktu je v chloroplastech vždy velké množství antioxidantních enzymů (např. superoxid dismutáza, askorbátperoxidáza) a substrátů (askorbát, glutation). Bližší popis komplexu antioxidantních reakcí (Halliwell-Asadova cesta) je uveden v kapitole 13.2.

Fotolýzou vody a navazujícími redoxními výměnami dochází k velkému nahromadění vodíkových iontů v lumen thylakoidu - při probíhající fotosyntéze tam mají asi tisíckrát větší koncentraci než ve stromatu (pH 5 v lumen, pH 8 ve stromatu). Potenciální energie tohoto gradientu je využita ke tvorbě ATP, a sice při transportu H^+ z lumen do stromatu ATP-syntázou. Ke tvorbě jedné molekuly ATP (z ADP) je nutný transport tří protonů. Tvorbu ATP na úkor chemického potenciálu vodíkových iontů nahromaděných v lumen při necyklickém elektronovém transportu nazýváme **necyklickou**

fosforylací na rozdíl od **cyklické fosforylace**, která využívá energie vodíkových iontů přenesených do lumen ze stromatu při cyklickém elektronovém transportu.



Obr.17. Schema změn redoxních potenciálů při transportu elektronů v tylakoidní membráně.

5.3 Sekundární procesy asimilace oxidu uhličitého, fotorespirace

Na popsané primární procesy v tylakoidních membránách navazuje vlastní asimilace CO_2 do organických sloučenin. K tomu slouží celý komplex biochemických reakcí probíhající 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:

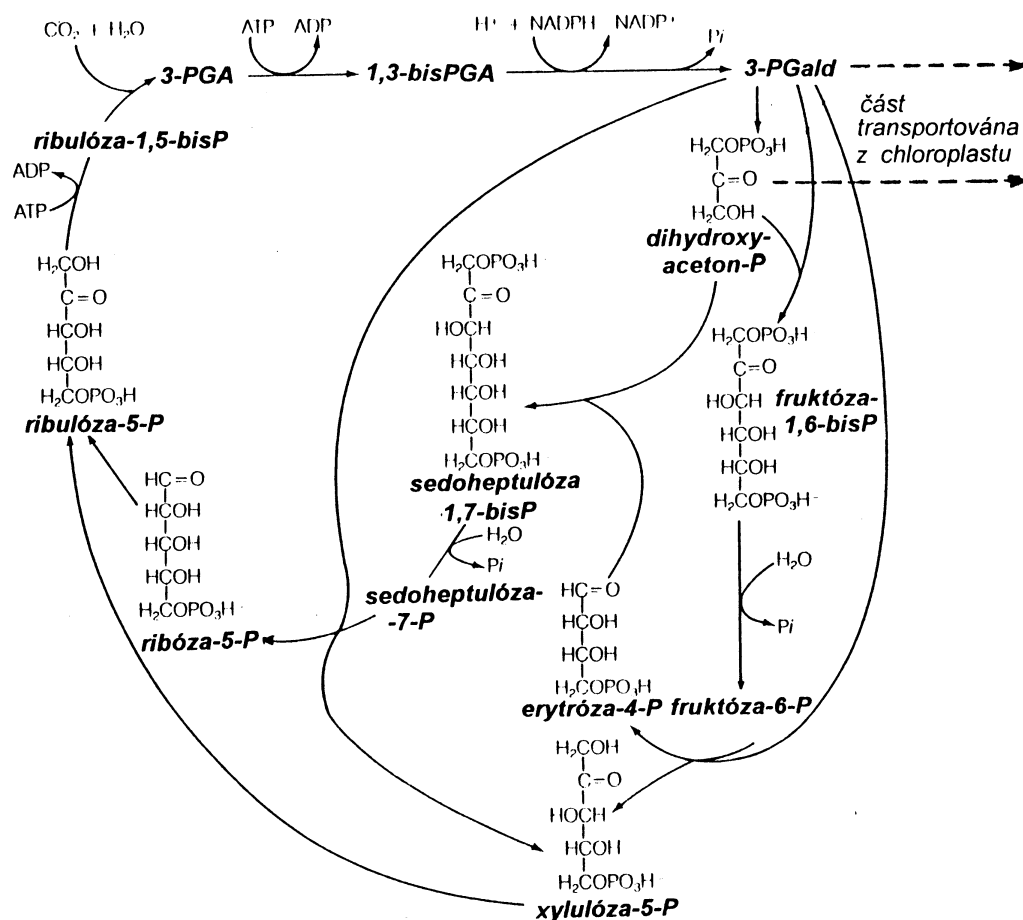
Karboxylace: CO_2 je vázán na pětiuhlíkatý cukr ribulóza-1,5-bisfosfát pomocí enzymu ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza. Prvním stálým produktem této reakce, která probíhá bez dodání energie, jsou dvě molekuly kyseliny 3-fosfoglycerové (3-PGA).

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 CO_2 vznikly dvě molekuly 3-PGA, bude tedy celkový náklad na jejich redukci dva ATP a dva NADPH.

Regenerace: Značně komplikovaná fáze celého cyklu ve které řetězec fosforylovaných cukrů vede k syntéze ribulóza-5-fosfátu, který je nutno další molekulou ATP (tedy už třetí v celkovém součtu) převést na ribulóza-1,5-bisfosfát. Ten pak slouží jako akceptor pro další molekulu CO_2 .

K čistému zisku jedné tříuhlíkaté molekuly (glycerinaldehyd-3-fosfátu) je zapotřebí fixovat tři molekuly CO_2 , tedy celý cyklus musí proběhnout třikrát dokola. 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 blízce příbuzný dihydroxyacetonfosfát, který vzniká snadnou izomerací z glyceraldehyd-3-fosfátu.



Obr.18. Schema reakcí Calvinova cyklu (bez uvedení příslušných enzymů, které je zprostředkovávají).

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.

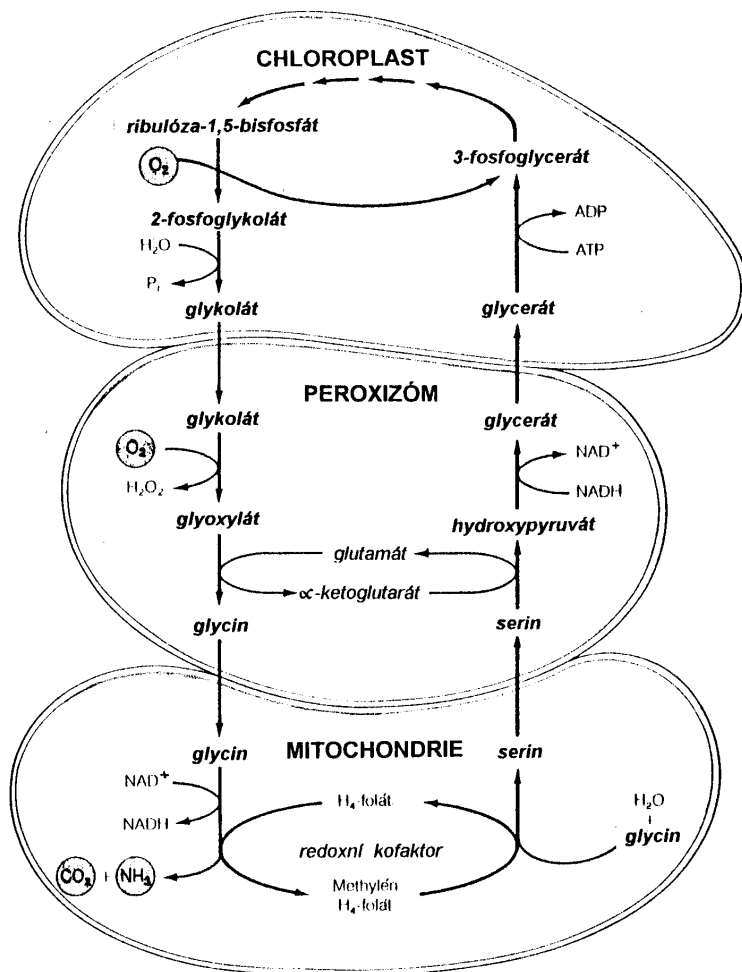
Nejdůležitějším enzymem Calvinova cyklu je **ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza**, běžně označovaná akronymem "*Rubisco*". Může fungovat, jak už jeho název napovídá, nejen jako karboxyláza, ale i jako oxygenáza, tedy na stejný substrát vnášet jak CO_2 , tak i O_2 . V listech rostlin má daleko 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 peroxizomů, 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. Zbývá čtvrtina uhlíku se ztrácí ve formě CO_2 . Při přepočtu na výchozí substrát (ribulóza-1,5-bisfosfát) činí ztráta uhlíku 10%, ovšem navíc přistupují ztráty energetické (2 ATP a 2,5 NAD(P)H na každou fixovanou molekulu O_2).



Obr.19. Průběh fotorespiračních reakcí (C₂-cyklus). Bližší popis je uveden v textu. (Taiz et Zeiger 1991, upraveno).

Schopnost enzymu *Rubisco* přenášet nejen CO₂, ale i O₂ na tentýž substrát, má obvykle za následek značné snížení účinnosti fotosyntetické fixace CO₂. Poměr mezi karboxylační a oxygenační aktivitou tohoto enzymu závisí především na poměru mezi koncentrací CO₂ a kyslíku v chloroplastu. Tento poměr je zase velmi závislý na koncentraci obou plynů v atmosféře. Za normálního složení volné atmosféry (21 objemových % O₂ a 0,035% CO₂), a při teplotě listu 25 °C, je poměr mezi rychlostí karboxylace a oxygenace 2 až 3. To znamená, že jedna čtvrtina až jedna třetina primárního substrátu využitelného v Calvinově cyklu podléhá fotorespiračním procesům a tedy i ztrátám (uhlíku, energie), jak již bylo uvedeno.

Při zvyšování teploty listu poměr mezi koncentrací CO₂ a O₂ v chloroplastech klesá, neboť CO₂ má za vyšších teplot menší rozpustnost ve vodě než kyslík. Podíl oxygenace, a tudíž i fotorespiračních ztrát, tedy nutně vzrůstá s teplotou.

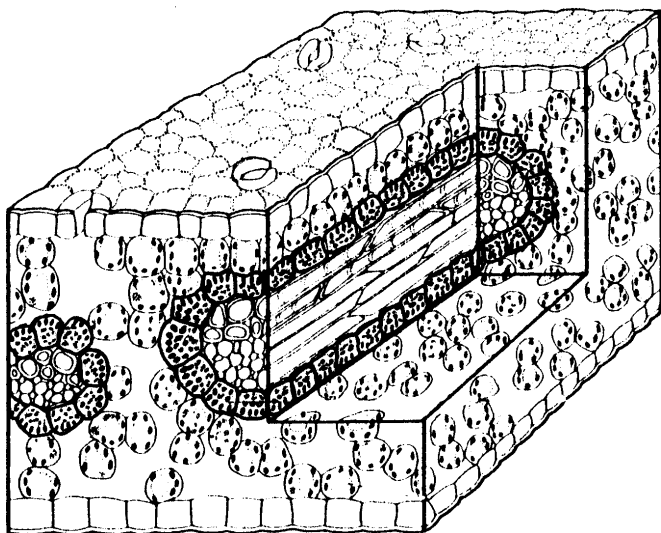
I když negativní vliv fotorespirace na celkovou efektivitu fixace CO₂ je nepochybný, pro celkový metabolismus není tak zcela bez užitku. Právě fotorespirační cestou se asi vytváří nejvíce glycinu a serinu. Fotorespirace může být prospěšná i při odvádění přebytků ATP a redukčního potenciálu za silného záření a nedostatku CO₂. To jsou ovšem zatím jen hypotézy. Jak uvidíme z dalšího výkladu, řada druhů rostlin docela dobře funguje i s fotorespirací trvale potlačenou. Místo hledání "smyslu"

fotorespirace bude asi nutné se smířit s tím, že enzym *Rubisco* se nám zachoval v téměř nezměněné podobě ještě z doby vzniku prvních autotrofních organismů s Calvinovým cyklem. Tehdy měla zemská atmosféra více CO₂ a méně kyslíku než v současné době, a tudíž tento enzym fungoval jen jako karboxyláza.

5.4 Fixační cesta C₄

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 prvé řadě umožňují zvýšit parciální tlak CO₂ v místech jeho fixace Calvinovým cyklem a tím potlačit oxygenázovou aktivitu *Rubisco*. Společným principem těchto adaptací u suchozemských rostlin je opakovaná karboxylace, u vodních rostlin pak ještě navíc aktivní transport iontů HCO₃⁻ z vnějšího prostředí do listů.

Podívejme se nyní, jak funguje metabolická modifikace označovaná jako **fixační cesta C₄**. U rostlin s tímto typem metabolismu (zkráceně **C₄-rostliny**) jsou chloroplasty schopné 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.



Obr.20. Průřez částí listu rostliny s fixační cestou C₄. Buňky pochvy cévních svazků, kde probíhá konečná fixace CO₂ do sacharidů, jsou zvýrazněny.

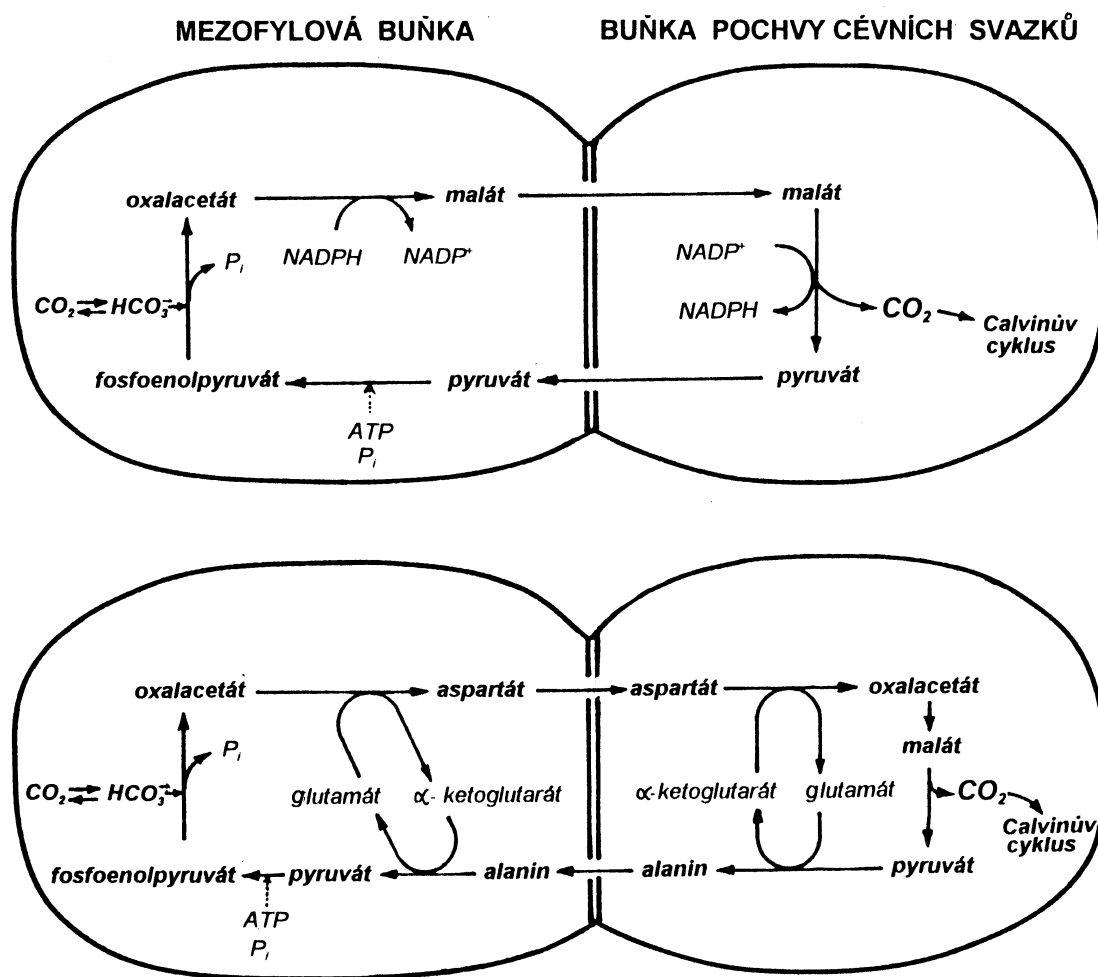
K prvotní karboxylaci dochází vždy v cytosolu běžných mezofylových buněk. Jsou při ní využívány ionty HCO₃⁻, které se v cytosolu vyskytují hojněji než rozpuštěný CO₂. Navazují se na tříuhlíkatý fosfoenolpyruvát za vzniku oxalacetátu (kyseliny oxaloctové).

Primární produkt reakce je tedy čtyřuhlíkatá sloučenina - proto označujeme tuto fixační cestu jako C₄ (na rozdíl od přímé fixace Calvinovým cyklem, označované jako C₃-fixační cesta, neboť prvním stálým produktem je tříuhlíkatá kyselina fosfoglycerová). Enzymem katalyzující reakci je **fosfoenolpyruvát karboxyláza** (zkráceně **PEP karboxyláza**), která má k CO₂ větší afinitu než *Rubisco*. Tím je také možný rychlejší příjem CO₂ do listu i při stejné vodivosti difuzních cest.

Další reakce, které následují po prvotní karboxylaci, mohou vést několika směry. U jedné skupiny C₄-rostlin, ke které patří např. kukuřice, vzniklý oxalacetát vstupuje do chloroplastů mezofylových buněk, kde se velmi rychle přeměňuje na malát. Ten je pak transportován do zvláštních buněk v pochvách cévních svazků, kde dochází k oxidativní dekarboxylaci na pyruvát. Uvolněný CO₂ je postupně zpracováván Calvinovým cyklem. Zbylý pyruvát je odváděn zpět do mezofylových buněk k využití v dalším fixačním cyklu.

U jiné skupiny C₄-rostlin (některé tropické trávy) 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 na CO₂ a pyruvát. Ve všech případech je uvolněný CO₂ 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.



Obr.21. Schema dvou variant fixační cesty C₄: varianta s transportem malátu (nahore) a s transportem aspartátu (dolní část obrázku). Existují i další modifikace C₄-metabolismu.

Fixační cesta C₄ je z hlediska využití CO₂ neobyčejně účinná. Nejen proto, že v mezofylu je CO₂ (resp. HCO₃⁻) 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 CO₂ (asi 1500 cm³.m⁻³, což je téměř desetkrát více, než bývá v mezofylových buňkách C₃- rostlin!) Zvýšenou koncentrací CO₂ 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 granálních (přitisknutých) částí tylakoidních membrán s fotosystémem II. Proto i produkce kyslíku rozkladem vody je poměrně malá.

Na druhé straně však celý mechanismus umožňující zvyšovat koncentraci CO₂ v oddělené skupině buněk schopných jeho vazby Calvinovým cyklem vyžaduje jisté provozní náklady. Na každou fixovanou molekulu CO₂ 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 C₄ mohou být zvláště úspěšné za podmínek, kdy příkon zářivé energie není limitující, a kdy omezujícím faktorem je spíše nedostatečný přísun CO₂ do listu. Také za vyšší teploty, která zvyšuje u C₃- rostlin fotorespirační ztráty, je výhodnější cesta C₄.

Je proto pochopitelné, že nejvíce druhů rostlin s fixační cestou C₄ nacházíme v tropických a subtropických zemích. Celkem se jedná asi o tisíc druhů z 16 čeledí, u

kterých byla tento typ metabolismu dosud dokázán (seznamy uvádí Downton 1975 a Andrés 1993). Nejpočetnější skupinu tvoří tropické trávy (včetně hospodářsky významných druhů, jako je proso, cukrová třtina a kukuřice), ale také asi 300 druhů dvojděložných bylin. C₄- 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 C₄ jen zcela vyjímečně. Jde především o nepočetnou skupinu druhů teplomilných trav (např. rodů *Digitaria*, *Bothriochloa*, *Setaria* a *Cynodon*).

5.5 Fixační cesta CAM

Ve velmi rozsáhlé a taxonomicky rozmanité skupině sukulentních rostlin nacházíme další zajímavou metabolickou variantu fotosyntetické asimilace CO₂, 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 C₄, dochází nejprve k vazbě HCO₃⁻ na fosfoenolpyruvát a až později k vlastní asimilaci v Calvinově cyklu. Celá řada dalších znaků je však zcela specifická.

První zvláštnost spočívá v tom, že **oba karboxylační procesy probíhají v téže 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 C₄- rostlin neprobíhá současně dekarboxylace a tak substrát pro karboxylaci (fosfoenolpyruvát) není 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 (= 3·10² mol·m⁻³), 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 CO₂**. Za světla je kyselina jablečná transportována do cytosolu, kde je dekarboxylována. Uvolněný CO₂ je v chloroplastech využit Calvinovým cyklem. Nyní se však oprávněně můžeme ptát, proč je CO₂ na světle spotřebováván právě Calvinovým cyklem, když je přítomna i účinnější PEP-karboxyláza? Ta se nachází dokonce přímo v cytosolu, tedy blíže substrátu (CO₂, respektive HCO₃⁻). Kromě toho v cytosolu těchto buněk je přítomna nejen PEP karboxyláza, ale i dekarboxylázy.

Správná funkce celé fixační cesty a časová posloupnost jednotlivých reakcí je nepochybně podmíněna dokonalou regulací aktivity enzymů. Zdaleka ne všem regulačním mechanismům rozumíme. Víme však, že PEP-karboxyláza

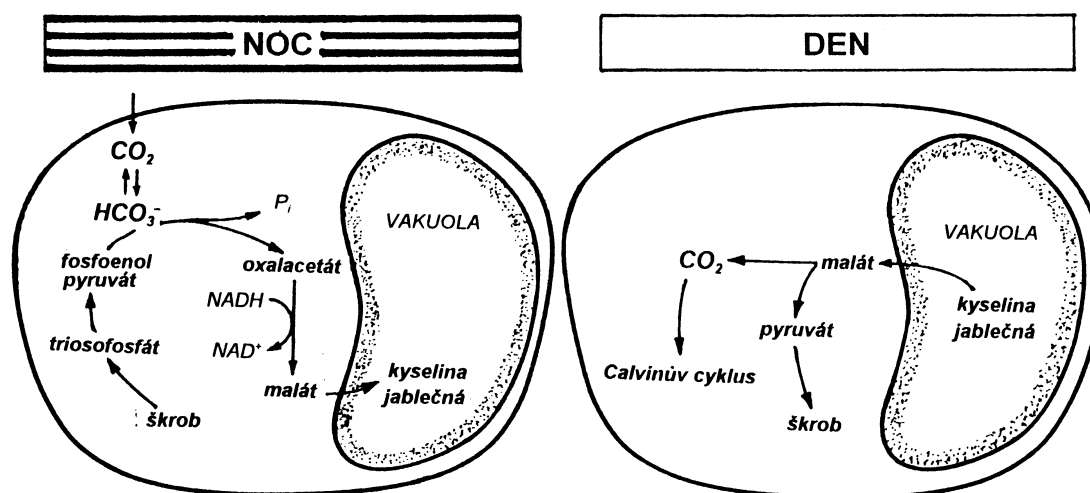
se v rostlinách s fixační cestou CAM vyskytuje **ve dvou reverzibilních formách**. Za tmy je to forma aktivní (dokonale funkční a navíc necitlivá ke koncentraci malátu). Působením záření však přechází do formy inaktivní (s velmi malou afinitou k CO₂, a ta je ještě navíc silně inhibována přítomností malátu). 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 C₄ je regulována právě opačně - v aktivní formě se vyskytuje pouze za světla.

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_4 , se prakticky neuplatňuje fotorespirace. Je to opět dáno tím, že k fixaci CO_2 Calvinovým cyklem dochází za podmínek velmi vysoké koncentrace CO_2 (po uvolnění z malátu, až $5000 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$!). Tato koncentrace zcela potlačuje oxygenázovou aktivitu *Rubisco*.

I přesto jsou však energetické náklady na fixaci jedné molekuly vyšší než u cesty C_4 . Kromě spotřeby 1 až 2 ATP na zpracování malátu (jako u C_4 -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_2 při syntéze rezervních sacharidů (ty jsou nutné jako zdroj energie při tvorbě PEP v noci).



Obr.22. Schéma fixační cesty typu CAM.

Fixační cesta CAM se vyskytuje přibližně u 10 až 15 tisíc druhů z více než 30 čeledí. Některé čeledi mají prakticky všechny druhy typu CAM (např. *Crassulaceae*, *Cactaceae*, *Mesembryanthemaceae*), avšak obvykle 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 sukulenty 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_4 -rostlin), jsou také možné různé **odchyly od popsaného typického průběhu** opakované karboxylace CO_2 . U řady druhů není využíván k denní fixaci Calvinovým cyklem pouze CO_2 získaný dekarboxylací malátu, ale i 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 a asimilují k nerozeznání stejně jako běžné C_3 -rostliny. Možnost přechodu z fixační cesty C_3 na CAM jim však umožňuje používat 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 využívají 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 sukulentů, které jsou toho schopny) probíhá:

- **za nedostatku vody v půdě** (nejčastější případ, hlavní výhodou je omezení transpirace),
- **při zasolení půdy** (omezení transpirace vede k menšímu příjmu solí),
- **za vysoké teploty** (např. u rostlin rodů *Sedum*, *Sempervivum*).

Je zcela nepochybné, že hlavní výhody fixační cesty CAM se uplatňují za nedostatku vody. Jedinečná schopnost CAM-rostlin přijímat CO₂ 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 CO₂ uvolněného z respiračních procesů. To jiné rostliny nemohou.

Hlavní centra vzniku a výskytu sukulentů s fixační cestou CAM leží v aridních oblastech tropů a subtropů. Jen málo z nich je mrazuvzdorných - právě pro velký obsah vody ve svých buňkách.

5.6 Souhrnné zhodnocení účinnosti fotosyntézy 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 fotosyntézy je užitečné posuzovat odděleně energetické přeměny v primárních a sekundárních procesech. Kolik je vlastně potřeba chemické energie na fixaci jednoho molu CO₂? Víme, že k zabudování jedné molekuly CO₂ 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 (Nobel 1991- přesné hodnoty jsou závislé na podmínkách, za kterých reakce probíhají. Dosti často se uvádí jen 33 kJ, viz např. Vodrážka 1992). Fixace jednoho molu CO₂ je tedy celkem spojena s náklady asi 590 kJ.

Na Calvinův cyklus jsou ale obvykle napojeny ještě další reakce, které jsou v podstatě neodělitelně spojeny s fixací CO₂ a které celkové náklady na fixaci zvyšují. U C₃-rostlin je to fotorespirace, u rostlin s fixační cestou C₄ a CAM opakovaná karboxylace. Z údajů uvedených v tab. 3 je zřejmé, že fotorespirační ztráty u C₃-rostlin zvyšují celkové náklady na fixaci CO₂ více, než koncentrační mechanismy u rostlin typu C₄ a CAM. Účinnost biochemických procesů fotosyntézy, uvedená v tab. 3, byla vypočítána jako poměr mezi energetickým ziskem (spalným teplem, které odpovídá obsahu volné energie v molu fruktózy, = 2804 kJ) a náklady příslušné fixační cesty.

Tabulka 3. Srovnání energetických nákladů a účinnosti v sekundárních (biochemických) procesech fotosyntetické asimilace CO₂ u tří hlavních typů fixačních cest (s využitím údajů, které uvádí Nobel 1991).

	C ₃	C ₄	CAM
Spotřeba na fixaci 1 molekuly CO₂:			
ATP	3,00	4-5	5,5-6,5
NADPH	2,00	2,00	2,00
Energetické náklady na fixaci CO₂ (kJ mol⁻¹):			
bez fotorespirace	590,00	640-690	715-765
včetně fotorespirace (průměr)	867,00	665,00	740,00
Energetické náklady na tvorbu fruktózy (kJ mol⁻¹):			
	5202,00	3990,00	4440,00
Energetická účinnost tvorby fruktózy:			
	0,54	0,70	0,63

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 potřebného množství NADPH a ATP pro sekundární procesy. Z dřívějšího výkladu již víme, že k redukci jedné molekuly CO₂ jsou nutné dvě molekuly NADPH a tři molekuly ATP. K redukci dvou molekul NADP⁺ 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 dvou NADPH na redukci jedné molekuly CO₂. Osm fotonů však sotva postačuje k získání nutných tří molekul ATP, neboť jejich tvorba vyžaduje 9 H⁺ (oxidací dvou molekul vody získáme 4 H⁺ a oxidací plastochinonu ve fotosystému II další čtyři, tedy celkem 8 H⁺). Připočteme-li navíc reakce přidružené ke Calvinovu cyklu (fotorespirace či opakované karboxylace), pak **k zabezpečení asimilace jedné molekuly CO₂ je 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) celého procesu fotosyntetické asimilace CO₂ je tedy přibližně 2804/12600 = 0,22 (= 22%).

Uvedené výpočty vycházely 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. Necyklický transport jednoho elektronu v tylakoidní membráně trvá přibližně pět milisekund. Ze znalosti průměrného počtu molekul asimilačních pigmentů na jednotku plochy listů běžných rostlin lze odhadnout, že při hustotě toku fotosynteticky aktivních fotonů, například $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, je excitována každá molekula pigmentů přibližně jedenkrát za sekundu (Nobel 1991). Pokud by se v jednom fotosystému nacházelo celkem 200 excitovatelných molekul pigmentů, tak při uvedeném toku fotonů by byla kapacita necyklického transportu elektronů v tylakoidech zcela nasycena (5 ms na jeden elektron odpovídá zpracování 200 elektronů za sekundu).

Při plném slunečním záření je hustota toku fotosynteticky aktivních fotonů zhruba desetkrát vyšší (asi $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a v takovém případě lze v asimilačních procesech využít jen jednu desetinu jejich energie. Zbylá část je přeměněna převážně na teplo. Vhodným rozmístěním listů v prostoru mohou rostliny do značné míry ovlivňovat využití dopadajícího záření, jak bude ještě blíže popsáno.

6 Fyziologický přístup ke studiu fotosyntézy

Pro své výjimečné postavení v životě rostliny je fotosyntetická asimilace CO_2 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 poznání vlastní podstaty asimilačních procesů, ale spíše na hledání vnitřních a vnějších faktorů omezujících **rychlost fotosyntézy** intaktních rostlin v přirozeném prostředí. Cílem fyziologického výzkumu fotosyntézy je jednak poznání mechanismu řídicího 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_2** do listů, méně často (např. u vodních rostlin) je používáno měření rychlosti výdeje kyslíku. V současné době se stále více využívá k odhadu rychlosti fotosyntézy i měření **fluorescence chlorofylu** *in vivo*.

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_2 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_2 a s příjmem kyslíku.

6.1 Záření a teplota jako hlavní vnější faktory řídicí rychlost fotosyntézy

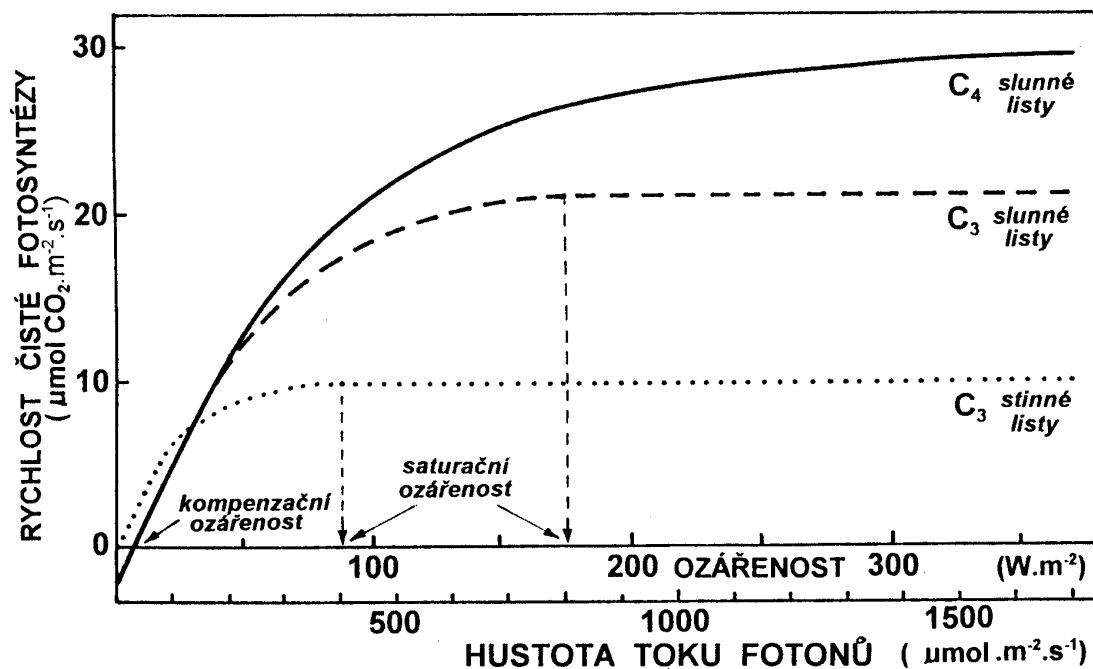
Pokud provádíme v přírodních podmínkách dlouhodobá měření rychlosti fotosyntézy a současně registrujeme i nejrůznější vnější abiotické faktory, můžeme pak stanovit jejich významnost pomocí statistických metod. Nejtěsnější korelace bývá téměř vždy zjišťována mezi fotosyntézou a zářením, na druhém místě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

Množství **záření** kolísá v denních i ročních cyklech a navíc v porostech se mění i 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 380 až 710 nm (= *fotosynteticky aktivní radiace, FAR*). Množství záření dopadající na jednotku listové plochy za jednotku času měříme jako **ozáření** v jednotkách toku energie ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$), či jako **hustotu toku fotosynteticky aktivních fotonů** (zkráceně PPF, z angl. *Photosynthetic Photon Flux*, $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Maximální hodnoty za jasného letního dne činí 400 až 500 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, či 2000 až 2200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ FAR. Rychlost čisté fotosyntézy nejčastěji měříme počtem molů 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 rychlost hrubé fotosyntézy je právě dostatečná na kompenzaci současně probíhající respirace (= **kompenzační ozáření**, dříve též nazývaná světelný kompenzační bod). Hodnota kompenzačního 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 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ (= přibližně 5 až 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 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 saturačního 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 saturačního ozáření mají i nízkou rychlost fotosyntézy při nasycení zářením.



Obr.23. Závislost rychlosti čisté fotosyntézy na množství fotosynteticky aktivního záření (pro srovnání jsou uvedeny energetické i kvantové jednotky) u listů kukuřice (C_4 -rostlina) a pšenice (C_3). Rostliny pšenice byly pěstovány jednak za dostatku světla, jednak v silném zastínění (ostatní kultivační podmínky byly shodné).

Již pouhým pohledem na světelnou křivku (přesněji pak po její derivaci) 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 výtěžek fotosyntézy (Q)**:

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

Při přesném výpočtu kvantového výtěžku vycházíme ze záření listem *pohlceného* - 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 nás informují o maximální účinnosti fotochemických procesů.

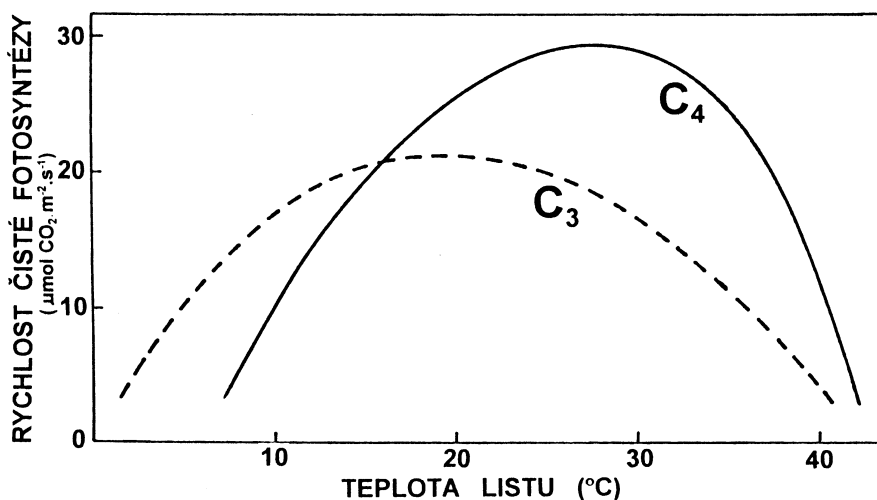
Tabulka 4. Kvantový výtěžek, kvantový požadavek a účinnost fotosyntézy za nízké ozáření listů rostlin s fixační cestou C₃ a C₄ za normální atmosférické koncentrace CO₂ a O₂ a při teplotě 30 °C (s využitím údajů: Ehleringer et Björkman 1977).

	kvantový výtěžek	kvantový požadavek	účinnost fotosyntézy
C ₃ - druhy	0,0524	19,08	0,12
C ₄ - druhy	0,0534	18,72	0,12

Jak je zřejmé z údajů v tab. 4, maximální účinnost fotosyntézy naměřená u intaktních listů je podstatně menší, než teoretické hodnoty uvedené v předešlé kapitole pro chloroplasty. Rozdíl je způsoben v první řadě pohlcením jisté části fotosynteticky aktivního záření v jiných strukturách listu, než v asimilačních pigmentech.

Rychlost fotosyntézy listů za vysokých hodnot ozáření (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 C₃ v rozmezí 15 až 25 °C, zatímco u C₄-rostlin bývá obvykle vyšší (25 až 35 °C).



Obr.24. Závislost rychlosti čisté fotosyntézy listů kukuřice (C₄-rostlina) a pšenice (C₃) na teplotě. Minimální a maximální teploty mohou být značně ovlivněny dobou působení teploty, teplotní optima jsou stálejší.

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 kladnou teplotní závislostí mitochondriální respirace. U C₃-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 zastavuje již při teplotách blízkých +5 °C. 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.

6.2 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 CO₂ v listech, či počet a uspořádání chloroplastů v mezofylových buňkách. Proto při podrobnějším zkoumání příčin rozdílů v rychlosti fotosyntézy nevystačíme pouze 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 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 CO_2 a O_2 v chloroplastu. Za normálních okolností je koncentrace O_2 vcelku stálá a omezující vliv má pouze koncentrace CO_2 . Její hodnoty (i při stálém složení vnějšího vzduchu) jsou silně 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 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 a na koncentraci CO_2 .

Interpretace světelných křivek je poměrně jednoduchá: počáteční, přibližně lineární část křivky, vymezuje interval hodnot ozáření, ve kterém asimilaci 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 CO_2 (či snížení 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 CO_2** . Je známo, že tato závislost je u většiny rostlin (zejména s fixační cestou C_3) téměř lineární až do hodnot, které jsou v čistém vzduchu běžné (okolo $350 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$). *Kompenzační koncentrace CO_2* (= průsečík CO_2 -křivky s abscisou) je u C_4 -rostlin obvykle nulová či velice blízká nule. U všech 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 CO_2 u 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 CO_2 ve vzduchu nedostatečná pro zajištění takové rychlosti jeho toku do chloroplastů, která by odpovídala kapacitě fotochemických a biochemických procesů u C_3 -rostlin. Zvýšení koncentrace 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 CO_2 , ale i vodivost difuzních cest pro CO_2 . Uvnitř listu (v intercelulárách a v chloroplastech) bývá při aktivní fotosyntéze koncentrace 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.

Přesné stanovení závislosti rychlosti fotosyntézy na CO_2 musí proto vycházet nikoli z jeho koncentrace ve vzduchu v okolí listu, ale v *intercelulárách* (C_i). Neumíme ji sice přímo měřit, ale můžeme ji vypočítat z rychlosti toku CO_2 do listu (= z gazometricky

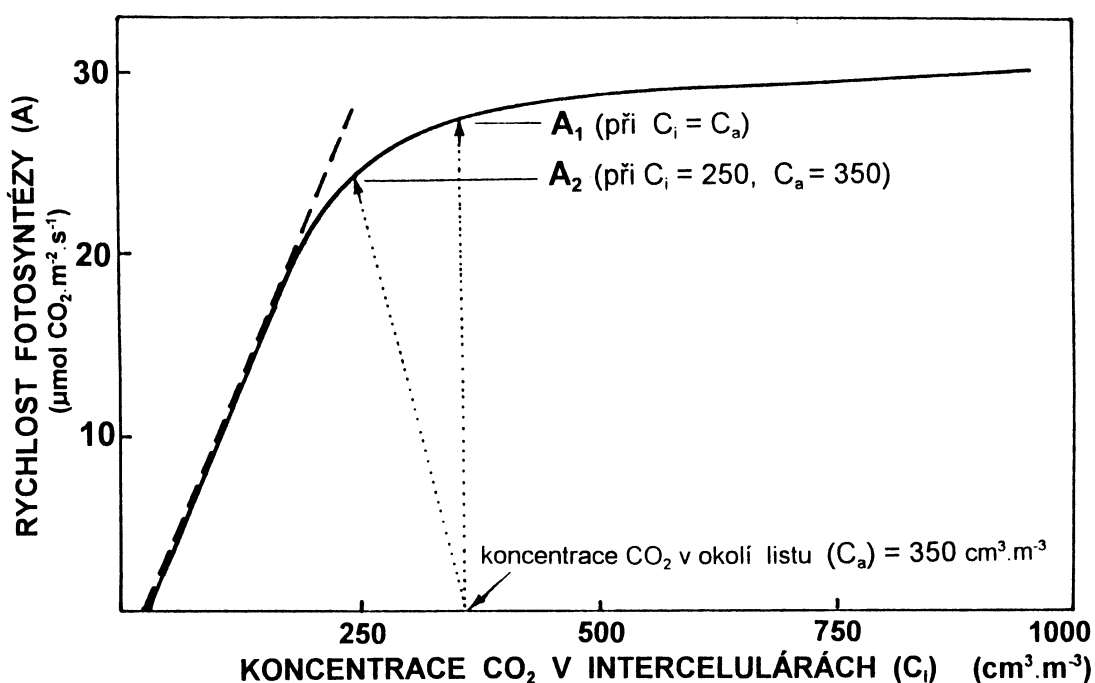
naměřené rychlosti čisté fotosyntézy, A), z vodivosti listu pro CO_2 (g_{CO}) a z koncentrace CO_2 ve vnějším vzduchu (C_a):

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

Postup při měření a výpočtu g_{CO} byl popsán již dříve (kap.4.3). Počáteční lineární úsek závislosti A na C_i (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_i (= plató CO_2 -křivky).

Za normální koncentrace CO_2 ve vzduchu ($350 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$) a saturační ozáření se hodnoty C_i pohybují nejčastěji mezi 200 až $250 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$, což bývá právě v oblasti největšího ohybu A/C_i -křivek. Rychlost fotosyntézy je v tom případě omezoována 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 (zvyší 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).



Obr.25. Závislost světelně nasycené rychlosti čisté fotosyntézy na koncentraci CO_2 v intercelulárách (A/C_i -křivka) a její využití při analýze limitujících faktorů fotosyntézy. Z rozdílu $A_1 - A_2$ lze určit omezení rychlosti fotosyntézy nedostatečnou vodivostí difuzních cest pro CO_2 . Bližší vysvětlení je v textu.

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. Ve všech těchto případech přesto zjišťujeme hodnoty C_1 lokalizované do oblastí 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 příštího století. Při této změně (z 350 na $700 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-3}$) se rychlost fotosyntézy většiny běžných druhů C_3 -rostlin zvyšuje přibližně o 40 až 50%, což se může projevit i v podstatném zrychlení růstu. 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 je v nenasyceném stavu, ale i díky potlačené fotorespiraci. U C_4 -rostlin je PEP-karboxyláza v normální atmosféře prakticky saturována CO_2 , a další zvýšení jeho koncentrace nemá významný vliv na zrychlení fixačních procesů.

Pokusy s dlouhodobou expozicí rostlin v uměle vytvořené "atmosféře budoucího století" ($700 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2 \cdot \text{m}^{-3}$ po několik měsíců až roků) ukazují, že za jistou dobu může dojít k postupnému poklesu rychlosti fotosyntézy ve srovnání s hodnotami na počátku expozice. Tento pokles souvisí se snížením aktivity enzymů (především *Rubisco*) a s hromaděním asimilátů v listech. Ovšem zdaleka ne všechny dosud testované druhy takto reagovaly.

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). Najít tedy příčiny, které vedou ke zpomalení tvorby

sacharózy (jako hlavního cukru transportovatelného do jiných orgánů), 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, semen, nových odnoží, atd.) 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.

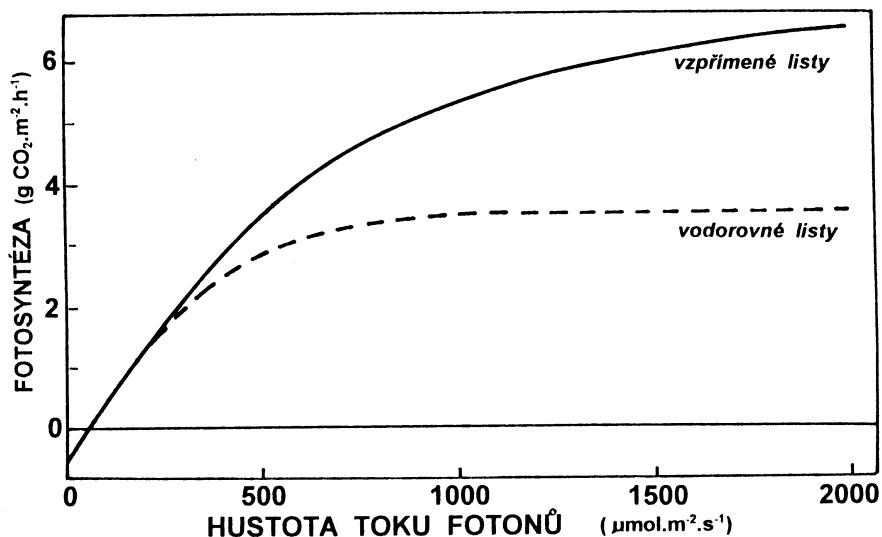
6.3 Fotosyntéza na úrovni porostu

Porosty rostlin jsou nejsložitější fotosyntetické struktury, jejichž chování nelze odvodit jen z funkčních charakteristik jednotlivých listů. Zvláštnosti vyplývají zejména ze složitého rozmístění listů v prostoru, což spolu s velkou heterogenitou jejich fotosyntetických parametrů vede k velkým rozdílům ve využívání dopadajícího záření.

K radiačnímu nasycení fotosyntézy celého souboru listů v porostech nedochází prakticky nikdy. Jednak proto, že některé listy jsou orientovány velmi šikmo ke směru dopadajícího záření, ale hlavně proto, že dochází k jejich vzájemnému stínění. V běžných, středně hustých porostech bývá celková plocha listů vztažená na jednotku plochy porostu (= **pokryvnost listoví**, angl. *Leaf Area Index, LAI*, $m^2 m^{-2}$) vždy větší než 1 (nejčastěji mezi 2 až 5). Světelná křivka porostu má proto podstatně jiný tvar než světelné křivky jednotlivých listů - je méně zaoblená a také hodnota kompenzační ozáření je vyšší.

Porosty rostlin sice nemohou nikdy plně využít fotosyntetické kapacity jednotlivých listů, ovšem na druhé straně vícevrstevně uspořádané listy využívají dopadající záření podstatně lépe, než listy rozložené v jedné souvislé vrstvě. K pochopení této skutečnosti si musíme uvědomit, jak je to vlastně s efektivitou využití záření u jednotlivých listů.

V oblasti blízké saturačním hodnotám ozáření, jak již víme, je mnoho dopadajícího záření absorbováno listem zcela bez užitku. Nejlépe je tedy využito záření u takových porostů, které mají velkou listovou plochu, a listy jsou přitom postaveny spíše vertikálně než horizontálně. V tom případě záření proniká i do hlubších vrstev porostu a je rovnoměrněji rozděleno na větší počet listů. Ozáření každého z těchto listů je pochopitelně nízká, což ovšem současně znamená, že využití záření ve fotosyntéze (účinnost fotosyntézy) listů i celého porostu je vysoká. U řídkých porostů (do hodnoty $LAI = 3$) však postavení listů nemá na využití záření celým porostem velký vliv. U těchto porostů totiž při vertikálním postavení listů velmi vzrůstá podíl záření, které není vůbec listy zachyceno a dopadá bez využití na povrch půdy.



Obr.26. Rychlost fotosyntézy hustého porostu zblochanu (*Glyceria maxima*) s různým sklonem listů a při různém množství dopadajícího záření (modelové výpočty). Rychlost fotosyntézy je vztažena na jednotku plochy porostu.

Při vysokých hodnotách LAI se neobyčejně zvyšuje heterogenita ozáření jednotlivých listů, přičemž spodní listy mohou být i za jasného počasí již velmi blízko kompenzačním hodnotám. Vzhledem k tomu lze u nich pozorovat některé závažné změny fotosyntetického aparátu, zejména velmi malý obsah karboxylačních enzymů. Dusíkaté látky jsou z těchto listů translokovány do mladších, kde je lze efektivněji využít.

I u velmi hustých porostů, u kterých dosahuje fotosyntetický příjem CO_2 rostlinami několik gramů na metr čtvereční za hodinu, jen stěží lze zjistit výraznější snížení koncentrace CO_2 ve vzduchu uvnitř porostu (jen asi o 1 až 5%). Turbulentní výměna vzduchu je i v hustých porostech po většinu dne velmi rychlá.

7 Respirační procesy

Téměř polovina všech sacharidů vytvořených fotosyntetickou asimilací oxidu uhličitého je v průběhu dne opět rozložena v souběžně probíhajících biochemických reakcích, označovaných souhrnně 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 CO_2 . Smyslem respirace není totiž pouze přeměna energie a její zpřístupnění pro jiné procesy, ale i tvorba jednodušších organických molekul, které jsou 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 s ním spojená oxidační fosforylace (na vnitřních membránách mitochondrií).

7.1 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 a fruktóza-6-fosfát). Tato zásoba se neustále doplňuje jednak z nových fotosyntátů (transportem triózafosfátů, především glycerinaldehyd-3-fosfátu z chloroplastů), jednak rozkladem složitějších sacharidů, zejména sacharózy, škrobu a fruktosanů, 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 vodíku pro redukcí pyridinového nukleotidu (NAD^+ na NADH). Při dalších přeměnách na pyruvát přechází fosfátová skupina na ADP za vzniku ATP.

U rostlin, na rozdíl od živočišných buněk, bývá častějším produktem glykolýzy **malát**, nikoli pyruvát. Ten vzniká také z fosfoenolpyruvátu jako pyruvát, ale nepřímo přes oxalacetát. Tvorbu oxalacetátu katalyzuje PEP-karboxyláza (viz obr. 28).

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 malátu a pyruvátu, ale i jiných meziproductů) pro další rozkladné i syntetické procesy.

Pokud mají buňky dostatek kyslíku, vzniklý malát či pyruvát je dále oxidován v mitochondriích. Za nedostatku kyslíku glykolýza sice probíhá, avšak hromadící 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 (laktát) nebo etanol. Při těchto reakcích dochází současně k regeneraci 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 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).

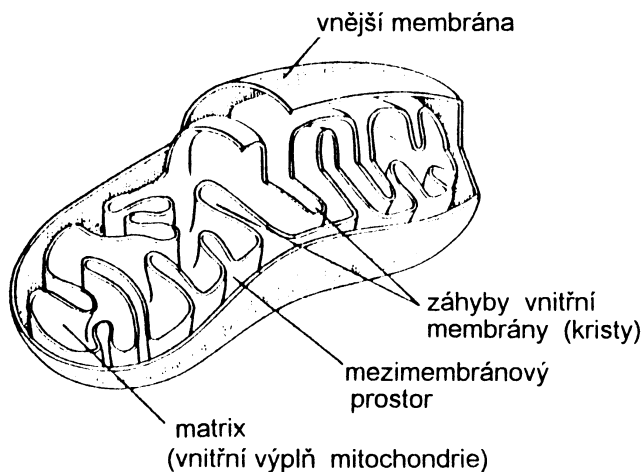
Paralelně s glykolýzou obvykle probíhá ještě jedna varianta rozkladu primárního substrátu označovaná jako **oxidační pentózový cyklus**. Na rozdíl od glykolýzy umožňuje úplnou oxidaci hexóz až na CO_2 , aniž by musely být využívány mitochondriální procesy. V první fázi tohoto cyklu dochází k oxidaci jednoho uhlíku v hexóze až na CO_2 za vzniku pentózy a dvou NADPH. Postupně se hromadící pentózové molekuly mohou být využity k tvorbě hexóz (regenerační fáze cyklu), a nebo též 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.

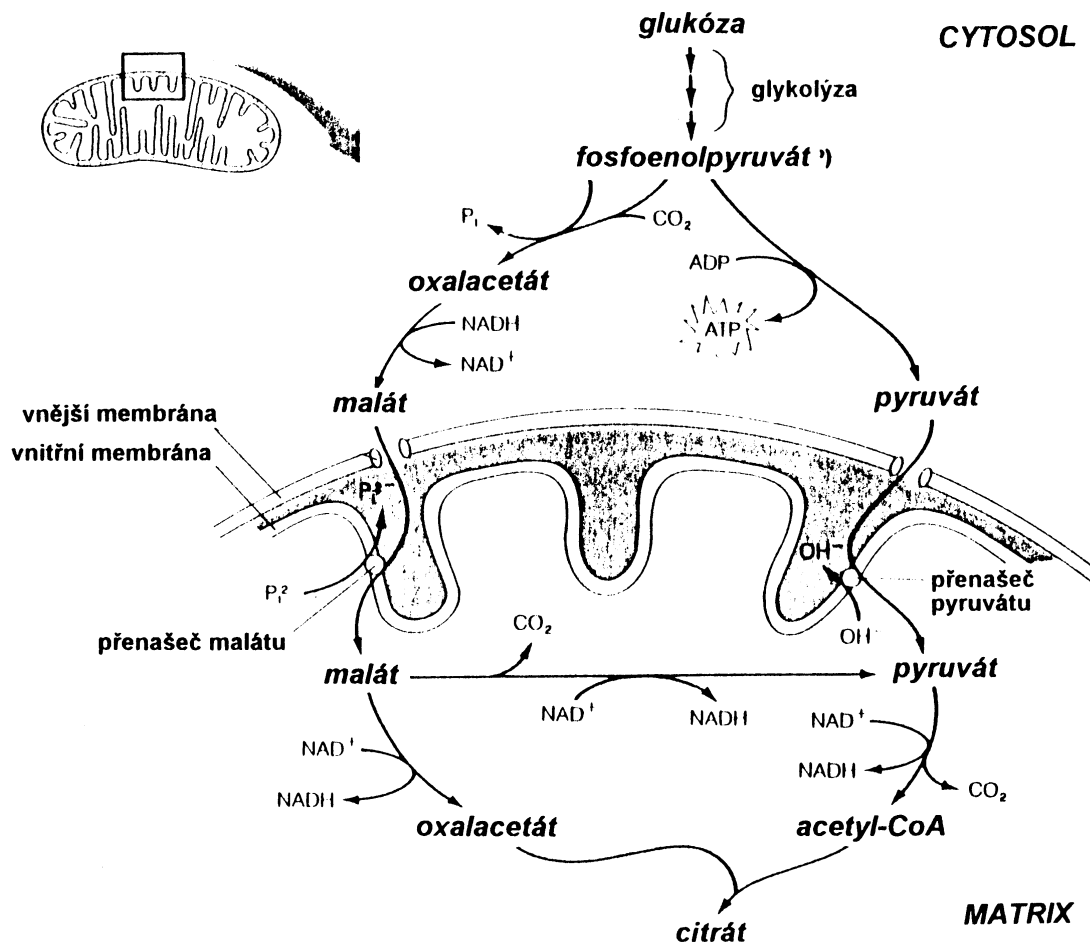
Inhibice světlem je nutná, aby se vyloučil jeho nepříznivý vliv na průběh Calvinova cyklu (konkurenčním odběrem glukóza-6-fosfátu).

7.2 Oxidační procesy v mitochondriích

Další oxidace malátu, pyruvátu a NADH, vytvořených v glykolýze, probíhá v mitochondriích - tam je teprve dosaženo největšího energetického výtěžku. Mitochondrie jsou obdobně jako chloroplasty semiautonorní organely 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*. Na jejich vnitřní straně je **základní hmota** (*matrix*) mitochondrie, z vnější strany pak mezimembránový prostor. Ve vnitřní membráně jsou hojné **transportní bílkoviny**, zvláště pak antiportní přenašeče: pyruvát/ OH^- , malát/ HPO_4^{2-} , a ATP/ADP. Hojné jsou také ATP-syntázy.

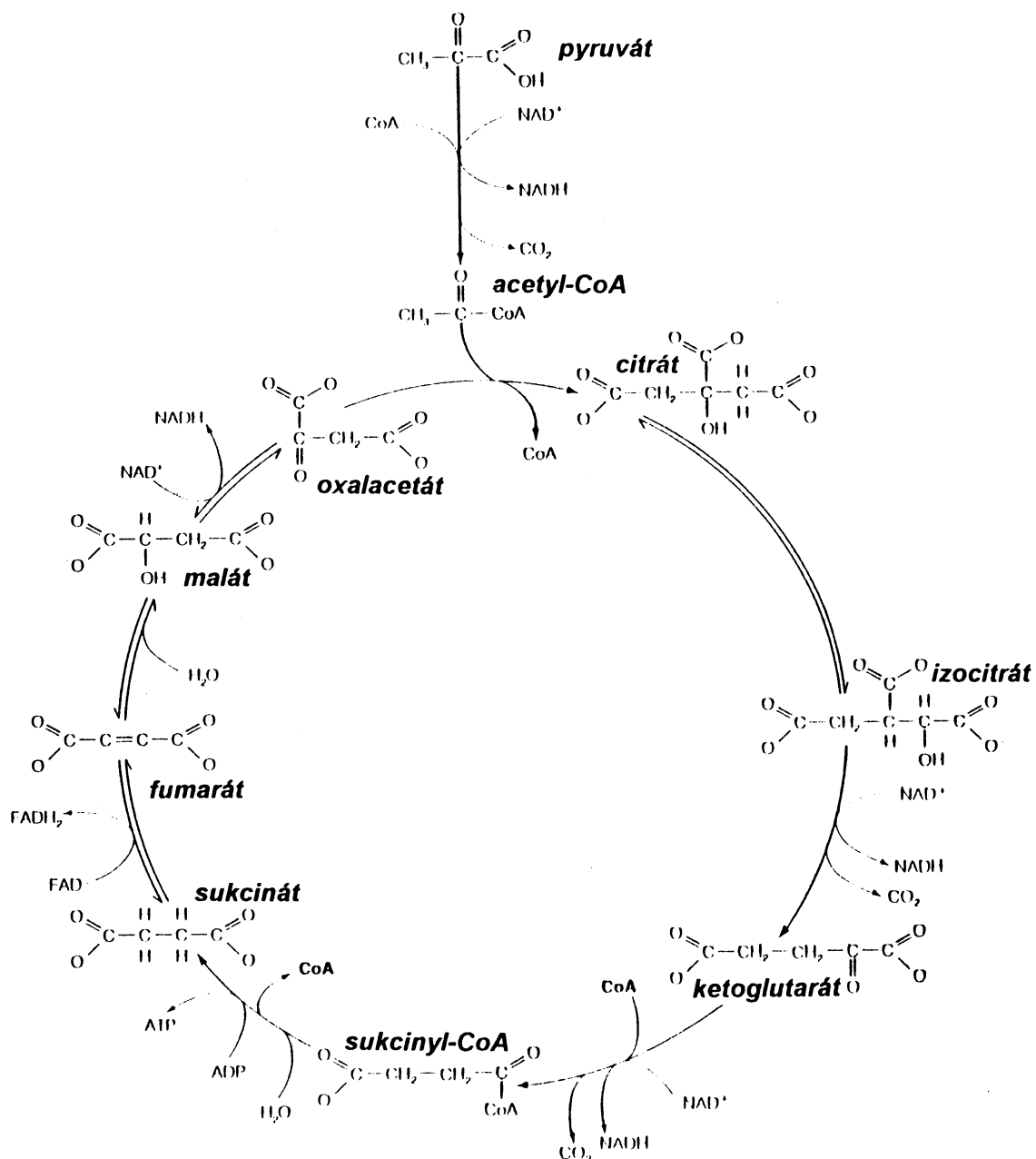


Obr.27. Obvyklá stavba rostlinné mitochondrie



Obr.28. Do rostlinné mitochondrie může vstupovat (přes specifické přenašeče) nejen pyruvát, ale i malát. Obrázek zachycuje obě tyto možnosti, které však nemusejí být využívány současně či stejně často.

Pyruvát transportovaný z cytosolu je v matrix mitochondrie nejprve dekarboxylován - uvolňuje se jedna molekula CO_2 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_2). Malát vchází do citrátového cyklu přímo. Elektrony z oxidačních reakcí jsou použity k redukci redoxních sloučenin (hlavně NAD^+), nedochází zde tedy k přenosu na konečný akceptor - kyslík. 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 meziproduktů pro nejrůznější syntézy (např. aminokyselin).



Obr.29. Zjednodušené schéma citrátového cyklu (nejsou uvedeny enzymy, zprostředkovávající naznačené reakce).

Konečný přenos elektronů z redukovaných 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 především na čtyřech **multiproteinových komplexech**, pevně zakotvených ve vnitřní membráně mitochondrie.

Komplex I obstarává dehydrogenaci a přenos elektronů z **NADH** (vznikajících v citrátovém cyklu) pomocí FMN (flavinmononukleotid) a tří až čtyř Fe-S proteinů s rozdílnými redox potenciály. Elektrony jsou přenášeny na **ubichinon**, který je chemicky i funkčně podobný plastochinonům v chloroplastech. Ubichinonu (a jeho redukované formy ubichinolu či hydrochinonu) je v

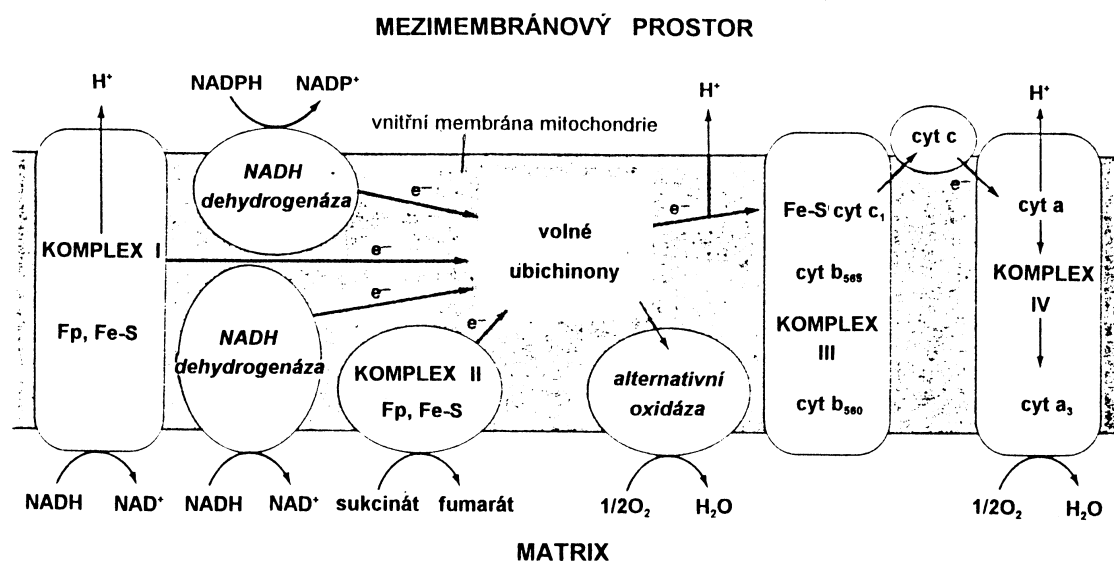
mitochondriální membráně vždy značná zásoba. Vzhledem k jeho pohyblivosti je důležitým prostředníkem pro několik dalších reakcí, které mohou probíhat souběžně.

Komplex II pracuje obvykle paralelně s komplexem I. Je k němu připojen jeden enzym z citrátového cyklu (sukcinátdehydrogenáza) a tak především zajišťuje přenos elektronů ze sukcinátu na ubichinon pomocí redoxního systému FAD - FADH₂ (flavinadeninukleotid), který je k uvedenému enzymu kovalentně vázán. Součástí komplexu II jsou též asi tři FeS-proteiny, fungující jako přenosové mezičlánky mezi FADH₂ a ubichinonem.

Komplex III, nazývaný též *cytochromreduktáza*, obsahuje dva cytochromy *b*, cytochrom *c*₁ a FeS-proteiny. Tyto redoxní systémy zprostředkovávají přenos elektronů z ubichinolu na další mobilní přenašeč, cytochrom *c*.

Komplex IV, známý jako *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.

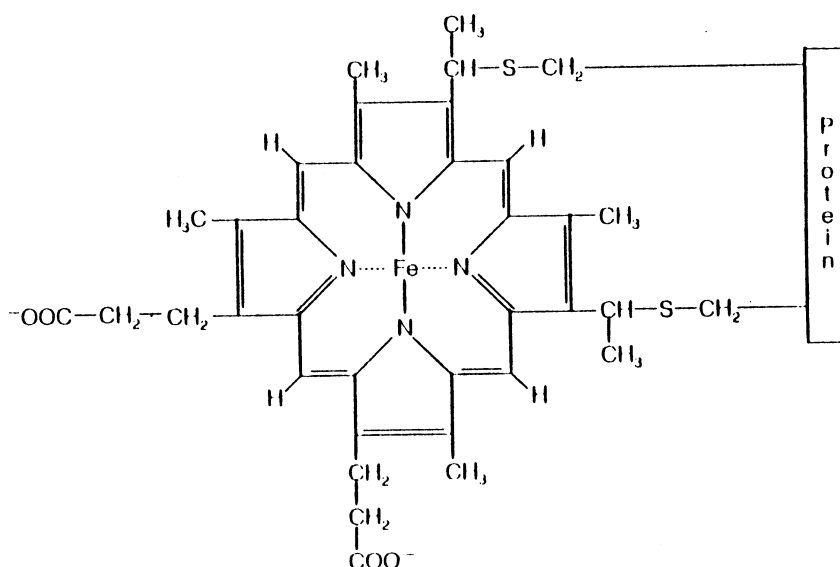
Kromě uvedených základních komplexů byly zjištěny v rostlinných mitochondriích ještě některé další pomocné systémy, umožňující v jistých úsecích hlavního řetězce souběžný transport elektronů. Především jde o **dva komplexy NADH-dehydrogenáz**, které mají obdobnou funkci jako komplex I. Jeden z nich je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



Obr.30. Hlavní proteinové komplexy s redoxními systémy, zapojené do přenosu elektronů ve vnitřní membráně mitochondrie.

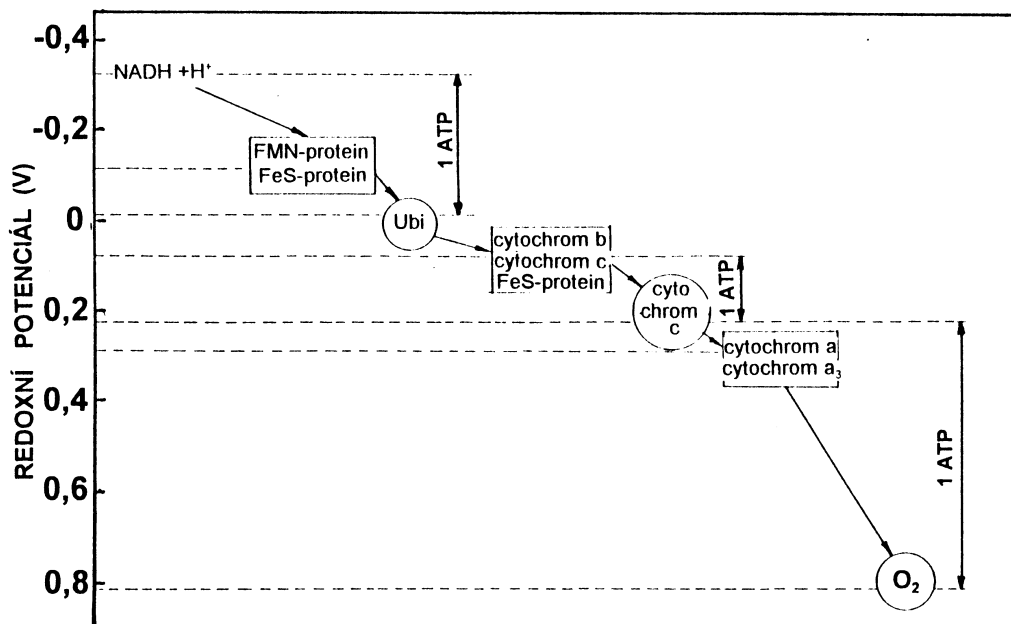
Pozoruhodnou zvláštností dýchacího řetězce rostlinných mitochondrií je existence **alternativní cesty**, která umožňuje přenos elektronů z ubichinolu na kyslík i bez účasti cytochromových komplexů. Funguje tedy i po jejich zablokování kyanidem - proto bývá též označována jako *kyanid-rezistentní cesta*. 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 tvorbě tepla).

Význam alternativní cesty pro rostliny je stále ještě předmětem výzkumu. Byla dokázána u všech dosud zkoumaných druhů a víme, že obvykle probíhá souběžně s cytochromovou cestou, i když méně intenzivně. Její podíl na celkovém toku elektronů však nápadně stoupá při nadbytku respiračního substrátu (např. za vysokých rychlostí fotosyntézy v listech) a proto je 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).



Obr.31. Struktura prostetické skupiny (hemu) u cytochromu typu c, ve které probíhají redoxní změny Fe^{2+}/Fe^{3+} .

U transportu elektronů v membráně mitochondrií (ve srovnání s obdobným transportem v chloroplastech) je nápadná velká **početnost redoxních systémů** a možnost větvení hlavního řetězce. Velký počet systémů je nutný, aby se dosáhlo pozvolného snižování velkého rozdílu elektrického potenciálu mezi redukovanými substráty a kyslíkem, a tím i účinného využití uvolňované energie převodem do makroergických vazeb ATP.



Obr.32. Změny redoxního potenciálu při přenosu elektronů v membráně mitochondrií a jejich využití pro tvorbu ATP.

Tvorbu ATP z ADP, která je spřažena s transportem elektronů v mitochondriích, označujeme jako **oxidační fosforylaci**. Obdobně jako v chloroplastech se na ní podílejí ATP-syntázy, využívající potenciální energii elektrochemického gradientu vodíkových iontů mezi matrix (pH asi 8,5) a mezimembránovým prostorem (pH asi 7). Gradient vzniká činností těch redoxních systémů, u kterých je přenos elektronů spojen s vazbou vodíkových iontů. Při přechodu do redukovaného stavu je přibírají z matrix, a při oxidaci je odštěpují na vnější stranu membrány. 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 hojné antiportové přenašeče ve vnitřní membráně.

7.3 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_2 a H_2O . 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). **Maximální účinnost** (efektivitu) respirace zjistíme z podílu mezi získanou energií (standardní volná energie 32 molekul ATP je přibližně 1,6 MJ) a vstupní energií jedné molekuly glukózy (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 můžeme dosáhnout. Zejména proto, že v rostlinné buňce probíhají obvykle současně i méně energeticky účinné respirační cesty, které výslednou účinnost nutně snižují. Jednak je to malátová varianta glykolýzy, 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 že při ní nevzniká žádný ATP. Nyní se však podařilo z této reziduální respirace vyčlenit jednu lépe definovanou složku, a sice takzvané **peroxidázové dýchání**. Nejde však o nějakou samostatnou respirační cestu, ale pouze o oxidaci NADH ($1 \text{ O}_2 / 2 \text{ NADH}$) katalyzovanou peroxidázami. Může mít však značný podíl (až 20 %) na celkových oxidačních procesech v buňkách.

Energetickou účinnost respiračních procesů v živé rostlině můžeme dnes studovat pomocí moderních fyzikálních metod. Převratnou událostí bylo zejména zavedení spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), která ve spojení s aplikací značeného fosforu (^{31}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_2 (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_2 . Již vzácněji se používá měření výdeje tepla pomocí speciálních kalorimetrů.

Výdej CO_2 stanovujeme jednak průtokovými gazometrickými metodami (ze změny koncentrace CO_2 ve vzduchu po průchodu okolo uzavřené rostliny či orgánu - tedy stejně jako při měření fotosyntézy), a jednak metodami neprůtokovými. Při nich vyloučený CO_2 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_2 a absorbcí vyloučeného CO_2 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_2 a spotřebu kyslíku a z toho pak vypočítat **respirační kvocient (RQ)**:

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

Pokud prodýchaný 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).

7.4 Vnitřní a vnější faktory řídicí 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.

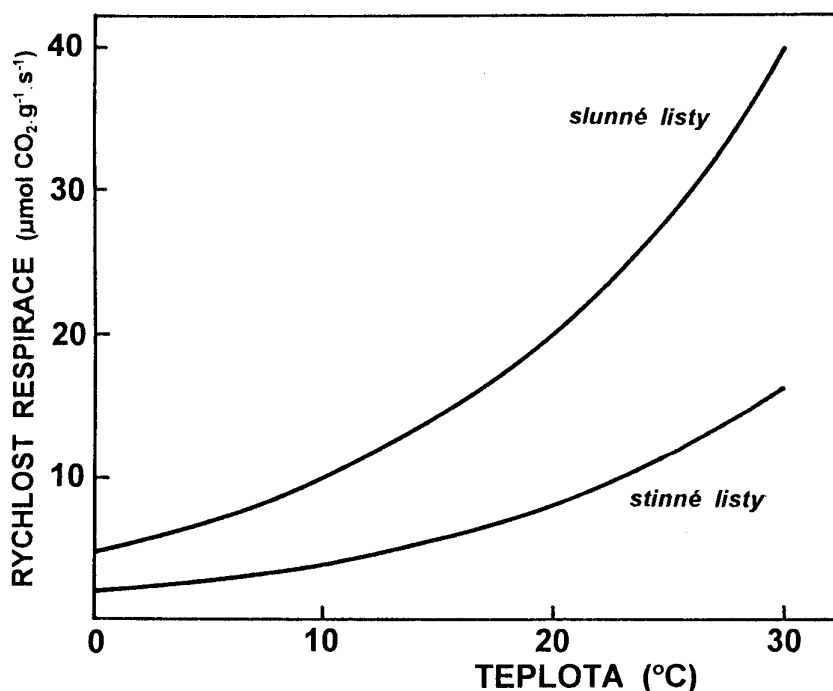
Rychlost respirace je dále závislá na **množství primárního substrátu** v buňkách. Zvýšené množství hexos (a také fosfátových iontů) v cytosolu zrychluje glykolýzu i ostatní respirační procesy. Rychlost hydrolýzy zásobních sacharidů je zcela nezávislá na aktivitě respiračních enzymů - je řízena samostatně, 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.

Rostliny jsou schopny regulovat nejen celkovou rychlost respirace, ale i její energetickou účinnost. Je to dáno existencí paralelních, energeticky odlišných variant glykolýzy (malátová a pyruvátová cesta), a zpracování NADH v mitochondriích (cytochromová a alternativní cesta). O vnitřních mechanismech, které určují aktuální stupeň využití jednotlivých cest, toho dosud mnoho nevíme. Je však známo, že za nedostatku energie v buňkách převažují energeticky účinnější cesty.

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 zdojnásobí (faktor $Q_{10} = 2$). To platí v teplotním rozmezí přibližně od 0°C do 25°C, pak se již rychlost respirace zpomaluje, a při teplotách okolo 40°C velmi rychle klesá. Zpomalení při vyšší teplotě může souviset s nedostatečně rychlou difuzí kyslíku (difuze se také zrychluje s teplotou, ale mnohem méně, s $Q_{10} = 1,1$). 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 °C !) a v hodnotách maxima, ale také rychlost vzestupu respirace v oblasti běžných teplot (např. od 10 °C do 20 °C) nemusí být zcela stejná. Rozdíly v Q_{10} se mohou pohybovat v rozmezí od 1,8 do 2,4.



Obr.33. Závislost rychlosti respirace na teplotě u listů třtiny křovištní (*Calamagrostis epigejos*) pěstované za dostatku světla a v silném zastínění (v obou případech $Q_{10} = 2$)

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 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). 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 (blíže viz kap. 13.6).

7.5 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 návaznosti respirace na jiné procesy do tří hlavních skupin:

- a) energetická a materiálová podpora růstových procesů (tvorby nových struktur),

b) podpora procesů údržby již vytvořených struktur (obměna proteinů, udržování funkcí membrán)

c) energetická podpora procesů spojených s příjmem živin a s transportem látek v rostlině.

Zabezpečení růstu (syntézy nové biomasy) energií a intermediárními 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 výpočet koeficientu energetické účinnosti syntetických procesů (Y):

$$Y = \frac{\text{energie v nově vytvořených sloučeninách}}{\text{energie ve spotřebovaných substrátech}}$$

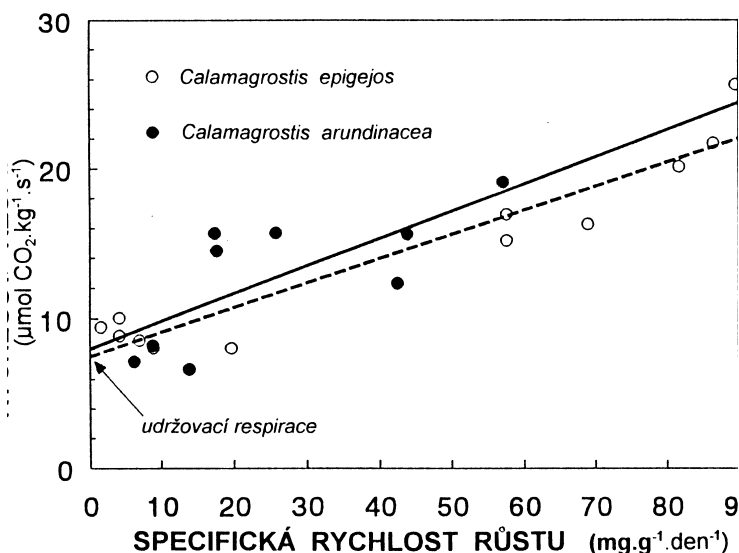
Tabulka 5. Množství jednotlivých složek biomasy rostlin, které se vytvoří heterotrofními procesy z jednoho gramu glukózy, a koeficient účinnosti jejich syntézy (Y). Na základě údajů z Penning de Vries (1972).

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 respirace, na které je údržba závislá. 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.



Obr.34. Ze série měření rychlosti respirace při různé rychlosti růstu lze odhadnout (extrapolací pro nulový růst) udržovací respiraci, a tedy i náklady na mimorůstové procesy. (V. Gloser, nepublikováno).

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 (Penning de Vries 1972). Náklady na jejich obměnu se odhadují zhruba na 10 mg glukózy na gram sušiny 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 ion 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 %.

7.6 Respirace jako složka uhlíkové bilance rostlin

V předcházející kapitole byl naznačen klíčový význam respirace pro energetické a materiálové zabezpečení růstových procesů. Je zřejmé, že tuto úlohu může respirace plnit pouze v návaznosti na fotosyntézu, která je primárním zdrojem chemické energie a organicky vázaného uhlíku. Přírůstek biomasy rostliny (ΔW) za jistý časový

interval je úměrný rozdílu mezi integrovanými hodnotami rychlosti hrubé fotosyntézy (F) a celkové respirace (R) za stejný časový interval, jako v případě W:

$$\Delta W = F - R$$

Z tohoto globálního pohledu vystupuje rychlost respirace jako ztrátová složka, která snižuje rychlost tvorby biomasy. Z dřívějšího výkladu však již máme jistou představu nejen o nepostradatelnosti respirace pro růst, ale i o okolnostech, které mohou podstatně měnit množství základního substrátu spotřebovaného na jednotku nově vytvořené biomasy - ať už se jedná o rozdíly v účinnosti syntetických či udržovacích procesů. Pro srovnávací účely bývá často výhodné používat souhrnnou charakteristiku označovanou jako **účinnost růstu** (Y_G). Vyjadřuje podíl mezi přírůstkem biomasy a hrubou fotosyntézou, a tedy i relativní podíl respirace na sníženém zisku biomasy z asimilátů:

$$Y_G = \frac{\Delta W}{F} = \frac{\Delta W}{\Delta W + R} = \frac{F - R}{F}$$

Pokud by účinnost růstu byla stále stejná, pak tvorba nové biomasy by byla přímo závislá jen na fotosyntéze:

$$\Delta W = Y_G \cdot F$$

Tomu tak ve skutečnosti není. Z řady důvodů se hodnoty účinnosti růstu během života rostliny mění v širokém rozmezí od nuly (pokud rostlina nezvyšuje množství biomasy, i když je fotosynteticky aktivní), až po maximální hodnoty okolo 0,7. Studium změn Y_G , ať už v průběhu ontogeneze, či za působení různých vnějších vlivů, má nepochybně značný praktický význam, a je také dobrým výchozím bodem pro hlubší analýzu příčin.

Metody, které používáme pro **stanovení účinnosti růstu**, jsou založeny především na přesném měření výměny CO_2 a přírůstku biomasy za nejméně jeden celodenní cyklus, obvykle však za několik dní. Integrované hodnoty hrubé fotosyntézy, která není gazometricky přímo měřitelná, odvozujeme z čisté fotosyntézy přičtením integrovaných hodnot současně probíhající respirace (ve světelné části dne považujeme její rychlost za stejnou jako v temnu). K vlastním výpočtům Y_G (podle vztahů uvedených nahoře) potřebujeme znát buď W a F, nebo jen gazometricky zjištěné hodnoty F a R, tedy bez nutnosti přímého měření W.

Principiálně odlišný způsob stanovení účinnosti růstu spočívá ve využití značeného uhlíku. Rostliny jsou ponechány po jistou dobu asimilovat $^{14}CO_2$ a za několik dnů či týdnů se stanoví úbytek značeného uhlíku z jejich biomasy. Tato metoda je dosti náročná nejen na technické provedení, ale i na správnou interpretaci výsledků.

Účinnost růstu bývá pravidelně vyšší u rychle rostoucích druhů. Růst přitom obvykle vyjadřujeme v hodnotách **specifické (relativní) rychlosti růstu**, což je rychlost tvorby biomasy celé rostliny vztahovaná na jednotku její hmotnosti:

$$r = \frac{dW}{dt} \cdot \frac{1}{W} \quad [g \cdot g^{-1} \cdot den^{-1} = den^{-1}]$$

Z praktických důvodů uvažujeme obvykle o specifické rychlosti růstu za časový interval jednoho dne. U extrémně rychle rostoucích rostlin ($r = 0,2$ až $0,5 \text{ den}^{-1}$) mohou

dosahovat hodnoty Y_G až 0,7, zatímco u pomalu rostoucích ($r = 0,01$ až $0,03 \text{ den}^{-1}$) bývá Y_G v rozmezí 0,3 až 0,5. Maximální hodnoty specifické rychlosti růstu, a tudíž i účinnosti růstu, jsou i za zcela shodných podmínek velmi odlišné u různých druhů. Jde tedy o vlastnost geneticky podmíněnou, která se ovšem v jistém rozmezí mění v průběhu ontogeneze i pod vlivem okamžitého stavu vnějších podmínek.

Specifická rychlost růstu se v průběhu ontogeneze vždy poměrně rychle snižuje. Účinnost růstu však klesá obvykle mnohem pomaleji, a někdy dokonce může i vzrůstat. Tento poměrně neočekávaný průběh bývá pozorován zejména u zemědělských plodin v období, kdy asimilační aparát je ještě dokonale funkční, ale přitom již započalo hromadění asimilátů v semenech a v jiných zásobních orgánech. Přírůstek biomasy vyvolaný hromaděním jen velmi málo přetvořených asimilátů (především oligo- a polysacharidů) je poměrně málo energeticky nákladný, a to jak z hlediska nákladů na syntézu (= vysoká účinnost syntetických procesů), tak i z hlediska nákladů na údržbu, což souvisí s malým podílem funkčních proteinů v zásobních orgánech.

Průměrná účinnost růstu běžných zemědělských plodin za celé vegetační období bývá nejčastěji v rozmezí 0,4 až 0,5. To tedy znamená, že nejméně jedna polovina vytvořených asimilátů je spotřebována v respiračních procesech. Vysoké hodnoty Y_G má například kukuřice a všechny obiloviny, menší pak okopaniny a luštěniny.

8 Asimilace dusíku, síry a fosforu

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_3^- a SO_4^{2-}) 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.

8.1 Fixace dusíku

Ačkoliv vzduch v atmosféře je tvořen převážně dusíkem a plyný 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 a 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 rodu *Rhizobium*, i když 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*).

Tabulka 6. Hlavní typy prokaryotních organismů se schopností fixace N₂, jejich hostitelské rostliny a potenciální hodnoty fixační aktivity (kg N na hektar za rok). Aktuální hodnoty rychlosti fixace kolísají v širokých mezích v závislosti na vnějších podmínkách. (Údaje převzaty od různých autorů).

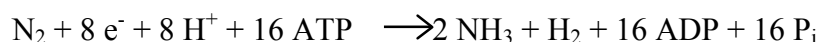
Fixátor	Hostitelská rostlina	Fixace
1. Hlízkové symbiózy		
Rhizobia		
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	bob (<i>Vicia faba</i>)	45 - 300
<i>Rhizobium trifolii</i>	jetel (<i>Trifolium sp.</i>)	45 - 350
<i>Rhizobium melilotii</i>	vojtěška (<i>Medicago sativa</i>)	50 - 400
Aktinomycety		
<i>Frankia sp.</i>	olše (<i>Alnus sp.</i>)	50 - 150
	řešetlák (<i>Hippophae sp.</i>)	180
Sinice		
<i>Anabaena azolae</i>	kapradiny rodu <i>Azolla</i>	50 - 80
<i>Nostoc sp.</i>	cykasy rodu <i>Macrozamia</i>	18
2. Asociativní symbiózy		
<i>Azotobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Azospirillum</i>	tropické trávy	3 - 10
3. Volně žijící fixátoři		
sinice (různé rody)		8 - 120
<i>Azotobacter</i> , <i>Clostridium</i> , aj.		1

Podívejme se trochu blíže na průběh nejčastější a také nejdůležitější symbiotické fixace dusíku bakteriemi rodu *Rhizobium*. Těchto bakterií známe celou řadu druhů, a ty mají vesměs specifickou afinitu 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 růst buněk, takže nakonec vzniká kořenová hlízka o velikosti 2 až 4 mm. Bakterie se usazují v cytoplazmě vnitřních (obvykle tetraploidních) buněk hlízek. V každé buňce jich bývá několik stovek. Usazené (nedělivé) a poněkud zvětšené bakterie nazýváme **bakteroidy**. Jednotlivé skupiny několika (5 až 20) bakteroidů jsou obaleny **peribakteroidní membránou**, která vzniká invaginací plazmatické membrány hostitelské buňky. V cytosolu buněk s bakteroidy se vytváří zvláštní protein (**leghemoglobin**) červené barvy, který reguluje vnitřní koncentraci kyslíku. Ta totiž musí být udržována na nízké úrovni, pokud má fixace dusíku probíhat efektivně.

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 aktivní spolupráce hostitelské rostliny. Bakterie jsou vábeny ke kořenům specifickými látkami (atraktanty) flavonoidního charakteru, vylučovanými z kořenů. Tyto sloučeniny současně indukují v bakteriích tvorbu specifických metabolitů (lipochitinové oligosacharidy), které

mají zásadní důležitost jednak pro úspěšný průnik bakterií do buněk kořene hostitelské rostliny, a také pro indukci tvorby několika desítek zvláštních proteinů kódovaných v genomu hostitelské rostliny a označovaných jako **noduliny**. Ty se podílejí na utváření hlízek a na zabezpečení fixační funkce symbiotických bakterií.

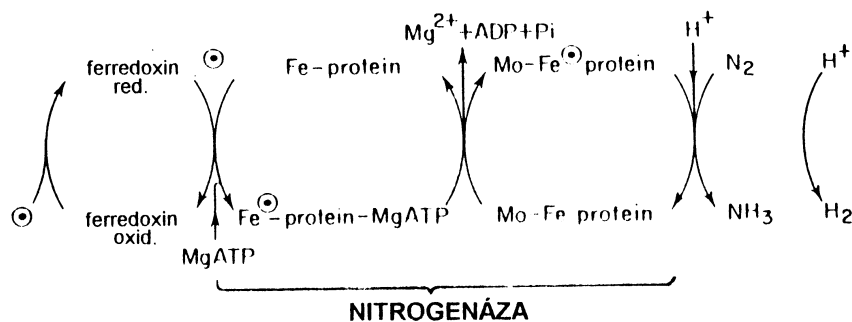
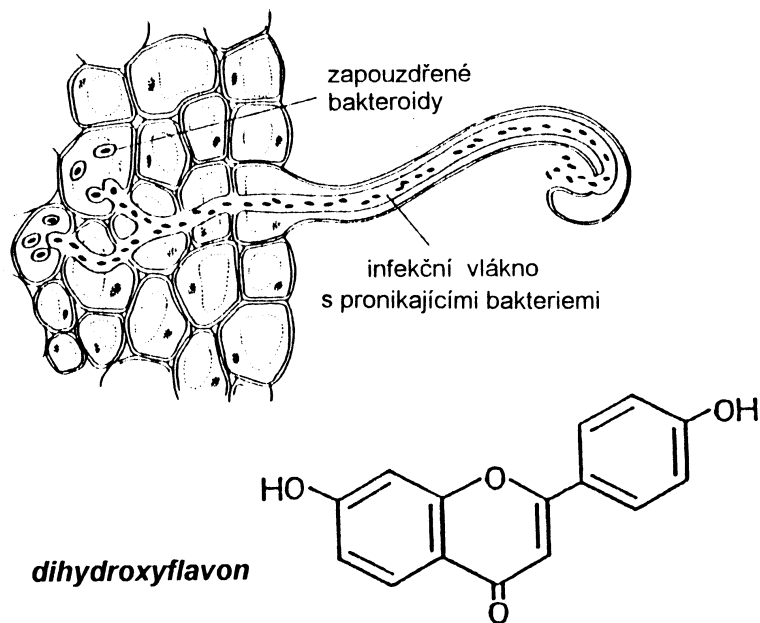
Vlastní **redukce molekulového dusíku** probíhá v bakterioidech, které jsou hostitelskou rostlinou zásobovány sacharidy. Redukce dusíku na amoniak je energeticky mnohem náročnější než např. redukce CO₂. Na každou molekulu N₂ je zapotřebí dodat minimálně 8 elektronů (z toho 6 na tvorbu NH₃ a 2 na současně probíhající tvorbu H₂), 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 ferredoxin nebo flavodoxin. Při přenosu elektronů v nitrogenáze je nutný i hořčík navázaný na ATP.

Odhad 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.

Aktivita nitrogenázy v bakterioidech je inhibována vyšší koncentrací kyslíku, ovšem současně kyslík je nezbytný pro respirační procesy. K regulaci koncentrace O₂ uvnitř buněk slouží nejen zmíněný leghemoglobin, ale také vysoký odpor pro difuzi kyslíku, který kladou vnější vrstvy buněk kořenových hlízek.



Obr.35. Pronikání bakterií rodu *Rhizobium* do kořenů hostitelské rostliny, struktura jedné ze sloučenin vylučovaných z kořenů vojtěšky (vábících baktérie), a schema vlastní fixace dusíku.

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 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_2 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_2 .

8.2 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 **nitrifikace**. 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.

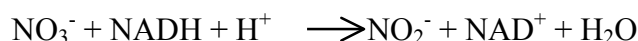
Je to tedy především dynamika půdní mikroflory, která rozhoduje o množství a typu sloučenin dusíku v půdě. Činnost mikrobů je ovšem řízena podmínkami prostředí. Tak například za nízké teploty a nízkého pH půdy je značně zpomalena nitrifikace (tvorba nitrátů) a hromadí se pouze amonné ionty, neboť amonifikační mikroflora 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 redukci na ionty amonné. K této redukci může docházet u některých druhů přímo v kořenech, u jiných až v listech. Místo redukce lze zjistit jednak analýzou xylemové šťávy, jednak stanovením aktivity enzymu nitrátoreduktázy v příslušných orgánech. Avšak i u druhů, které obvykle redukuje veškeré nitráty v kořenech, může někdy docházet k jejich transportu do listů, a to v těch případech, kdy aktivita nitrátoreduktázy 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 redukci (oxidační číslo dusíku se mění z +5 na -3 !). Také je užitečné si všimnout, že se spotřebovává více vodíkových iontů než elektronů. I když jeden H^+ se vrací při inkorporaci NH_4^+ do proteinů, celkově musí docházet k úbytku H^+ . Pro zachování optimálního pH v buňkách jsou tedy nezbytné jisté kompenzační mechanismy. U kořenů obvykle zjišťujeme snížený výdej H^+ do půdního roztoku a naopak zvýšené vylučování OH^- a aniontů organických kyselin (pH půdy 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 aktivita PEP-karboxylázy je stimulována zvýšeným pH. Celý reakční systém bývá označován jako **biochemický pH-stat**.

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



Tato reakce probíhá za účasti enzymu nitrátoreduktázy v cytosolu buněk (ne v organelách). **Nitrátoreduktáza** je klíčovým enzymem při asimilaci nitrátů v rostlinách, na který se právem soustřeďuje intenzivní výzkum. Dnes již víme, že se jedná o komplex

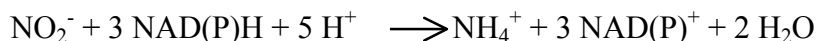
složený ze dvou totožných podjednotek (homodimer). Každá z nich obsahuje tři prostetické skupiny: FAD, hem a molybdenový komplex.

Množství nitrátreduktázy v rostlinách silně kolísá v závislosti na genotypu i na celé řadě faktorů prostředí. 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 potenciální aktivita nitrátreduktázy 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). Maximální aktivita nitrátreduktázy (daná hlavně rychlostí její syntézy) bývá měřitelná asi 6 až 12 hodin po zvýšení koncentrace nitrátů v buňce. Aktivita tohoto enzymu je také stimulována světlem - jednak díky vyšší produkci reduktantů (může být využíván jak NADH, tak i NADPH), ale pravděpodobně i jinými, na světle závislými mechanismy (zvýšený transport NO_3^- z vakuol a syntéza enzymu v závislosti na informacích z fytochromového systému). Stimulace světlem je ale podmíněna přítomností nitrátů v buňce - pouze tedy umocňuje účinek substrátové indukce.

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 **nitritreduktázy**:



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 je do přenosu elektronů na nitritreduktázu zapojen protein velmi podobný ferredoxinu.

Amonné ionty, vytvořené z nitrátu či přijaté kořeny z půdy, působí velmi nepříznivě na buněčný metabolismus (zejména inhibují tvorbu ATP) a proto jejich rychlá vazba do dalších sloučenin (u příjmu z půdy přímo v kořenech) je životně důležitá. První reakcí je obvykle tvorba **glutaminu** (amidovou vazbou na glutamát) za spotřeby jedné molekuly ATP. Glutamin je hlavní sloučeninou, která umožňuje rostlinám skladovat rezervní dusík v organické vazbě, proto také bývá v hojné míře obsažen v zásobních orgánech.

Cesty syntéz dalších dusíkatých sloučenin v rostlinách jsou již problematikou čistě biochemickou. Jde především o tvorbu nejrůznějších aminokyselin. Ta začíná u glutaminu, z něhož vzniká glutamát. Aminoskupina glutamátu pak může být dále přenášena transaminací na různé organické kyseliny za vzniku aminokyselin. Celkový počet organických sloučenin s obsahem dusíku je u rostlin mnohem větší než u živočichů - mnohé z nich slouží jako ochrana vůči patogenům a herbivorům.

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.

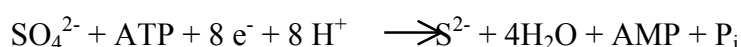
Celý další růst a vývoj rostliny je provázen maximální úsporností v hospodaření s organicky vázaným dusíkem. Zvláště dramatické změny nastávají při stárnutí orgánů a při

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 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 dusíkem z listů (tedy i z karboxylačních enzymů), a to i za cenu snížené tvorby sacharidů.

8.3 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 redukci síranů obvykle dochází v chloroplastech listů, v omezené míře může probíhat i v kořenech (asi 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 redukci přenosem elektronů - u listů je

donorem ferredoxin. Je zapotřebí celkem osmi elektronů, neboť oxidační číslo síry se mění z +6 na -2. Celý proces redukce síranového iontu v APS není dosud uspokojivě popsán. Konečným produktem je však siričkový iont, který je velmi rychle vestavěn do organických vazeb. Naprostá většina asimilované síry je použita ke tvorbě aminokyselin **cysteinu** a **metioninu**, které nemusí být pouze součástí bílkovin, ale i některých dalších látek (například koenzymu A).

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 (H_2PO_4^-), pouze ve výjimečných případech (za vysokého pH) jako HPO_4^{2-} . Koncentrace těchto iontů v půdním roztoku jsou vždy extrémně nízké (0,5 až 2 μM) 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 translokováno 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.