

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

# **Transport oxidu uhličitého listem hypostomatických rostlin**

Diplomová práce

**Bc. Jitka Neuwirthová**

Školitel: doc. Ing. Jiří Šantrůček, CSc.

České Budějovice 2015

Neuwirthová, J. 2015: Transport oxidu uhličitého listem hypostomatických rostlin. [Carbon dioxide transport through the hypostomatous plant leaf. Mgr. Thesis, in Czech] – 73 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

Mesophyll conductance is (together with stomatal conductance) a crucial component of diffusion limitations of photosynthesis and it is important to understand the mechanisms of CO<sub>2</sub> fluxes through the leaves. Here I tested a new technique for estimation of drawdown in CO<sub>2</sub> concentration across hypostomatous leaves based on carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of leaf cuticle and cuticular waxes isolated from opposite leaf sides.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 24. 4. 2015

.....  
Bc. Jitka Neuwirthová

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému školiteli doc. Jiřímu Šantrůčkovi za vedení během celé mé práce, trpělivou pomoc, konstruktivní připomínky a cenné podmínky. Dále chci poděkovat celému kolektivu laboratoře katedry experimentální biologie rostlin, zvláště pak Mgr. Martině Drtinové a Ing. Láďovi Markovi. Velké díky patří profesorovi Lukasovi Schreiberovi a Dr. Viktorii Zeisler za vlídné přijetí na Institutu buněčné a molekulární botaniky, Univerzitě v Bonnu, kde probíhala část měření. Za velkou podporu vděčím a děkuji také své rodině a přátelům, včetně těch zvířecích.

## Obsah

Seznam použitých zkratk.....	1
1. Úvod.....	2
1.1 Transport oxidu uhličitého listem.....	2
1. 1. 1 Průduchová vodivost.....	3
1. 1. 2 Mezofylová vodivost.....	5
1. 1. 3 Stabilní izotopy uhlíku $^{12}\text{C}$ a $^{13}\text{C}$ .....	8
1. 2 Kutikula, její struktura a funkce.....	11
1. 2. 1 Struktura rostlinné kutikuly.....	12
1. 2. 2 Syntéza vosků.....	16
1. 3 Vývoj průduchů.....	18
1. 3. 1 Vývoj průduchů.....	19
1. 3. 2 Environmentální regulace hustoty průduchů.....	20
1. 3. 3 Vliv koncentrace oxidu uhličitého na vývoj průduchů.....	21
2. Cíle práce.....	24
3. Materiál a metody.....	24
3. 1 Rostlinný materiál.....	24
3. 2 Gazometrické měření.....	25
3. 3 Anatomické vlastnosti listů.....	26
3. 4 Vizualizace povrchu listu <i>F. elastica</i> pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.....	27
3. 5 Izolace kutikul.....	27
3. 6 Měření propustnosti kutikuly izolované z listu <i>F. elastica</i> pomocí vážkové analýzy.....	28
3. 7 Extrakce kutikulárních vosků.....	29
3. 8 Kvantitativní a kvalitativní analýza složení kutikulárních vosků rostliny <i>F. elastica</i> .....	29
3. 9 Analýza obsahu stabilních izotopů uhlíku.....	29

3. 10 Výpočet vnitřní listové koncentrace CO <sub>2</sub> .....	30
3. 11 Výpočet poklesu koncentrace CO <sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou hypostomatického listu.....	30
3. 14 Statistické vyhodnocení.....	32
4. Výsledky .....	33
4. 1 Anatomické vlastnosti listů <i>F. elastica</i> .....	33
4. 2 Propustnost izolované kutikuly <i>F. elastica</i> měřená pomocí vážkové analýzy.....	36
4. 3 Tloušťka kutikuly, $d_c$ [ $\mu\text{m}$ ].....	37
4. 5 Kvantitativní a kvalitativní analýza složení kutikulárních vosků u <i>F. elastica</i> .....	39
4. 6 Vizualizace povrchu listu <i>F. elastica</i> pomocí skenovacího elektronového mikroskopu .....	44
4. 7 Analýza stabilních izotopů uhlíku a výpočet $C_i$ .....	45
4. 8 Výpočet poklesu koncentrace CO <sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou listu .....	47
5. Diskuse.....	49
5. 1. Anatomické vlastnosti listů <i>F. elastica</i> , varianty G a T .....	50
5. 2. Izotopové složení listu a kutikuly.....	51
5. 3. Tloušťka kutikuly a její propustnost pro vodu .....	52
5. 4. Pokles koncentrace CO <sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou listu.....	53
6. Závěr .....	55
7. Seznam citované literatury .....	56
8. Přílohy.....	69

## Seznam použitých zkratek

Zkratka	Název	Jednotka
<i>A</i>	rychlost asimilace CO <sub>2</sub>	μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
<i>C<sub>a</sub></i>	koncentrace CO <sub>2</sub> vnější atmosféry	μmol·mol <sup>-1</sup>
<i>C<sub>i</sub></i>	koncentrace CO <sub>2</sub> uvnitř listu	μmol·mol <sup>-1</sup>
<i>C<sub>c</sub></i>	koncentrace CO <sub>2</sub> v chloroplastu	μmol·mol <sup>-1</sup>
<i>C<sub>b</sub></i>	koncentrace CO <sub>2</sub> v mezibuněčném prostoru na abaxiální straně listu	μmol·mol <sup>-1</sup>
<i>C<sub>d</sub></i>	koncentrace CO <sub>2</sub> v mezibuněčném prostoru na adaxiální straně listu	μmol·mol <sup>-1</sup>
<i>d</i>	tloušťka listu	mm
<i>d<sub>c</sub></i>	tloušťka kutikuly	μm
<i>g</i>	vodivost	mol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
<i>g<sub>m</sub></i>	mezofylová vodivost	mol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
<i>g<sub>ias</sub></i>	mezofylová vodivost v plynné fázi	mol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
<i>g<sub>liq</sub></i>	mezofylová vodivost v kapalně fázi	mol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
<i>LMA</i>	množství listové sušiny na jednotku plochy	mg·cm <sup>-2</sup>
<i>P</i>	propustnost kutikuly pro vodu	m·s <sup>-1</sup>
PAR	fotosynteticky aktivní radiace	μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
PPFD	hustota toku fotonů v oblasti fotosynteticky aktivního záření	μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
<i>r</i>	difuzní odpor	m <sup>2</sup> ·s·mol <sup>-1</sup>
<i>SD</i>	průduchová hustota	mm <sup>-2</sup>
<i>SI</i>	průduchový index	%
VPDB	Vienna PeeDee Belemnite, standard	
<sup>12</sup> C, <sup>13</sup> C	stabilní izotopy uhlíku lišící se obsahem 1 neutronu	
δ	izotopový poměr, vyjadřuje množství izotopu vzhledem ke standardu	
Δ	izotopový poměr, vyjadřuje změnu izotopového signálu v produktu oproti substrátu	

# 1. Úvod

Primární karboxylační enzym  $C_3$  rostlin, Rubisco, má poměrně malou afinitu k oxidu uhličitému. Navíc má kromě karboxylační také oxygenační aktivitu, tedy může vázat místo oxidu uhličitého kyslík. Důsledkem toho funguje i při současně zvyšující se atmosférické koncentraci  $CO_2$  z méně než jedné poloviny své maximální karboxylační kapacity. Transport  $CO_2$  z atmosféry napříč listem a jeho dostatečná koncentrace v chloroplastech listu je jednou z hlavních limitací rychlosti fotosyntézy a růstu rostlin, která vytváří na rostliny selekční tlak pro přizpůsobení anatomie listu k dosažení vyšší koncentrace  $CO_2$  v okolí enzymu Rubisco. Je proto třeba dobře porozumět mechanismům toků  $CO_2$  napříč listem a také difuzním odporům, které musí překonat.

Tato práce navazuje na pilotní studii prováděnou Šantrůčkem a kol. (nepublikovaná data), která se zabývala měřením poklesu koncentrace  $CO_2$  během transportu mezibuněčnými prostory napříč hypostomatickým listem. Metoda je založená na měření izotopového složení kutikulárních membrán a kutikulárních vosků izolovaných z opačných stran listu 39 rostlinných druhů. V 70-ti % případů byl naměřen pokles koncentrace  $CO_2$  mezi mezibuněčným prostorem u abaxiální (průduchové) a adaxiální (neprůduchové) strany listu a průměrný pokles koncentrace byl 2 % napříč rostlinnými druhy a čeleděmi. V této navazující studii jsem chtěla zjistit, zda je tento pokles koncentrace ovlivněn anatomickou strukturou listu, potažmo vnějšími podmínkami (především ozářeností), které strukturu listu moduluje.

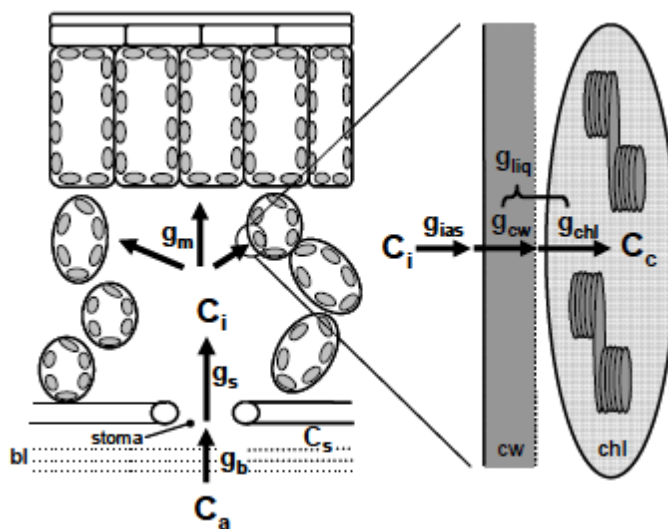
## 1.1 Transport oxidu uhličitého listem

Při procesu fotosyntézy musí být oxid uhličitý transportován z atmosféry až do stromatu chloroplastu, kde dochází k jeho zabudování, tedy ke karboxylaci. Mechanismem transportu je difuze. Během této cesty je tok  $CO_2$  limitován řadou difuzních odporů<sup>1</sup>. Prvním z nich je **odpor hraniční vrstvy**, jedná se o vrstvu vzduchu u povrchu listu, kde je proudění vzduchu laminární a transport látek pomalejší než v okolí. U náběžné hrany (okraje) listu je tloušťka hraniční vrstvy nejmenší a roste ve směru toku až k maximální hodnotě v místě, kde proud vzduchu opouští list. Směrem kolmo od povrchu listu stoupá rychlost proudění vzduchu exponenciálně,

---

<sup>1</sup> Difuze je přirozený proces přechodu látky z prostředí se svou vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací, v našem případě jde o difuzi plynů, hlavně  $CO_2$  a vodní páry. Ty mohou během své cesty narazit na překážku, kterou je třeba překonat a která se charakterizuje difuzním odporem ( $r$ ). Difuzní odpor je definován jako velikost hnací síly transportu, v tomto případě jde o rozdíl koncentrací,  $\Delta c$  (např. v  $\mu\text{mol } CO_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) na jednotku toku  $F$  (např. v  $\mu\text{mol } CO_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Jednotkou difuzního odporu je pak  $\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Častěji než odpor se dnes používá jeho obrácená hodnota, difuzní vodivost  $g$ , vyjadřovaná např. v  $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

objeví se turbulentní proudění a ve větší vzdálenosti je již rychlost proudění shodná s okolím. Protože vlastnosti hraniční vrstvy nejsou v rámci listu homogenní, pro matematické výpočty se užívá dohodnutá zástupná veličina, tzv. účinná tloušťka hraniční vrstvy, což je tloušťka vrstvy nehybného nebo čistě laminárně proudícího vzduchu. Velikost účinné tloušťky je nepřímo úměrná rychlosti větru a přímo úměrná velikosti listu. Vliv hraniční vrstvy na celkový transport  $\text{CO}_2$  bývá v přírodních podmínkách malý a často je zanedbáván (Nobel 1991). Dalšími, již značnými, limitacemi jsou difuze skrz průduchy a transport  $\text{CO}_2$  v listu. Transport v listu zahrnuje cestu z podprůduchové dutiny přes mezibuněčný prostor, přes buněčnou stěnu, cytoplasmatickou membránu, cytosol buňky, membrány chloroplastu a nakonec až do stromatu chloroplastu (obr. 2) (Evans and vonCaemmerer, 1996) (Neuwirthová 2012). Série difuzních bariér je často vyjadřována jako řada odporů, protože ale dále popisují difuzi  $\text{CO}_2$  v kontextu toků, používám dále veličinu vodivosti ( $g$ ), která je k odporu inverzní ( $g = 1/R$ ) a tok se s ní mění přímo úměrně.



**Obr. 1:** Schéma difúzní cesty  $\text{CO}_2$  z okolního vzduchu ( $C_a$ ) přes průduchy ( $C_s$ ) a mezibuněčný prostor ( $C_i$ ) do chloroplastu ( $C_c$ ). Znáznorněna je i vodivost hraniční vrstvy ( $g_b$ ), průduchová vodivost ( $g_s$ ) a mezofylová vodivost ( $g_m$ ). Tři složky mezofylové vodivosti jsou v detailu zobrazeny v pravé části obrázku – vodivost skrz mezibuněčný prostor ( $g_{ias}$ ), vodivost skrz buněčnou stěnu ( $g_{cw}$ ) a vodivost do chloroplastu ( $g_{chl}$ ) (Hisem, 2011)

### 1. 1. 1 Průduchová vodivost

Průduchy jsou útvary na pokožce listu tvořené dvojicí svěracích buněk a umožňují rostlině kontrolovat výdej vody a příjem oxidu uhličitého. Tato regulovatelná bariéra umožňuje udržovat v rovnováze dostatečný příjem  $\text{CO}_2$  a současně přijatelnou ztrátu vody během transpirace.



Velikost průduchové štěrby je ovlivňována rozdílem turgoru ve svěracích buňkách a v podpůrných buňkách. Je známo hned několik mechanismů regulace a to jak vnějšími faktory, tak vnitřně fyziologicky. Jedná se o reakci průduchů na červené a modré světlo, na změnu koncentrace CO<sub>2</sub> v mezibuněčném prostoru, vliv vlhkosti vzduchu nebo reakci na přítomnost fytohormonu kyseliny abscisové (Procházka et al., 1998) (Neuwirthová, 2012).

Vodivost průduchů ( $g_s$ ) je veličina úměrná velikosti průduchové štěrby a počtu průduchů na jednotku plochy listů. Z anatomických parametrů průduchů lze tuto vodivost podle následující rovnice počítat (Weyers and Meidner 1990):

$$g_s = \frac{\textit{efektivní difuzní koeficient} \cdot \textit{frekvence průduchů} \cdot \textit{plocha póru}}{\textit{hloubka póru} + \textit{"koncová korekce"}} \quad \text{Rovnice 1}$$

Výsledky z těchto výpočtů jsou srovnatelné s měřením  $g_s$  pomocí porometru (Vangardingén et al., 1989). Nicméně i přes částečně úspěšné pokusy o mechanistickou predikci otevření průduchů na základě parametrů prostředí (např. (Collatz et al., 1991) zatím neexistuje spolehlivý model, který by dynamiku pohybu průduchů a jejich reakce na vnější prostředí popisoval univerzálně.

Otevírání průduchů (a tedy zvyšování  $g_s$ ) je indukováno modrou a červenou složkou PAR (photosynthetically active radiation) (Serrano et al., 1988; Frechilla et al., 1999; Kinoshita and Shimazaki, 2001; Briggs and Christie, 2002; Roelfsema et al., 2006; Lawson, 2009). Modrá složka aktivuje H<sup>+</sup>-ATPázu v plazmatické membráně, dojde k hyperpolarizaci membránového potenciálu spolu se souběžnou acidifikací apoplastu, což vede k přesunu draselných iontů skrz napětově ovládané K<sup>+</sup>- kanály. Tím dojde k poklesu vodního potenciálu a k následnému nasání vody. Zvětší se objem vakuol a díky specifickému, asymetrickému uložení mikrofibril v buněčných stěnách průduchů dojde ke zvětšení průduchové štěrby (Shimazaki et al., 2007). Reakce průduchů na červenou složku PAR je zřejmě spřažena s procesem fotosyntézy. Tato reakce může být potlačena pomocí DCMU [3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimethylurea], inhibitoru fotosystému PSII (Olsen et al., 2002). Za fotoreceptor této reakce je považován chlorofyl (Zeiger et al., 2002).

Také je obecně známo, že se zvyšující se koncentrací CO<sub>2</sub> dochází ke snižování průduchové vodivosti a existují dvě teorie vysvětlující tento jev. Jedno z možných vysvětlení je pomocí zeaxantinu, jehož koncentrace je závislá na PAR a  $C_i$  (koncentrace CO<sub>2</sub> v podprůduchové dutině), a který ovlivňuje v závislosti na své koncentraci citlivost na modrou

složku PAR (Zeiger et al., 2002). Druhá teorie je založena na pozorování, že ATP vzniklé při fotosyntéze se přesouvá z chloroplastů průduchů do cytosolu, kde aktivuje  $H^+$  pumpu plasmatické membrány (Serrano et al., 1988). Množství ATP (stejně jako zeaxantinu) se zvyšuje se zvyšujícím se pH tylakoidů (tím pádem i se zvyšujícím se PAR). Naopak při zvýšené aktivitě Calvinova cyklu koncentrace ATP klesá (tudíž i s rostoucím  $C_i$ ) (Buckley et al., 2003). Pravděpodobné ale je, že se jedná o dva mechanismy fungující zároveň (Messinger et al., 2006) (Neuwirthová 2012).

### 1. 1. 2 Mezofylová vodivost

Mezofyl je základní pletivo v listech umístěné mezi dvěma listovými pokožkami. Jedná se o hlavní fotosyntetické pletivo rostliny, do jehož buněk a chloroplastů v nich musí  $CO_2$  proniknout. Mezofylová vodivost ( $g_m$ ) zahrnuje difúzi  $CO_2$  mezibuněčným vzdušným prostorem (složku  $g_{ias}$ , kde *ias* označuje intercellular air space) a buněčnými strukturami ( $g_{liq}$ , kde *liq* znamená „v kapalně fázi“) až do míst karboxylace v chloroplastu a je dnes považována za významný faktor limitující fotosyntézu (Evans et al., 2009). Složka  $g_{ias}$  je většinou považována za malou ve srovnání s  $g_{liq}$ , proto většina prací zkoumá posledně jmenovanou a  $g_{liq}$  se občas ztotožňuje s  $g_m$ . Této konvence se držím i v následující podkapitole.

#### Mezofylová vodivost pro $CO_2$ v kapalně fázi, $g_{liq}$ :

Mezofylová vodivost je konečná a proměnná, a hraje klíčovou roli v limitaci fotosyntetické produktivity (Niinemets et al., 2009). Velká variabilita v  $g_m$  byla naměřena mezi odlišnými druhy, listovými formami anebo stanovišti, kde rostliny rostly (Flexas et al., 2008; Warren, 2008). Zatímco rychlé změny  $g_m$  v reakci na měnící se podmínky jsou pravděpodobně závislé na biochemických faktorech, jako je změna propustnosti membrán pro  $CO_2$  zprostředkovaná aquaporiny (Hanba et al., 2004; Flexas et al., 2006b), maximální  $g_m$  se zdá být odvozena od anatomických vlastností listu (Niinemets et al., 2009; Tosens et al., 2012). Zjevný je negativní vztah mezi specifickou hmotností listu ( $LMA$ , *leaf dry mass per area*; tj. hmotnost sušiny listu vztažená na plochu listu;  $g \cdot m^{-2}$ ), která je větší u listů s robustnější stavbou, a  $g_m$  způsobený velkým poklesem koncentrace  $CO_2$  při cestě z podprůduchové dutiny do chloroplastu (Flexas et al., 2008; Niinemets et al., 2009).  $LMA$  je určována dvěma složkami: tloušťkou listu a hustotou listu ( $D_L$ , *leaf density*;  $g \cdot cm^{-3}$ ). Tomás a kol (2013) udělali studii na 15 rostlinných druzích, měřili anatomické vlastnosti listů a mezofylovou vodivost. Jejich výzkum ukázal pozitivní vztah mezi  $LMA$  a  $D_L$  (oproti slabé korelaci s tloušťkou listu). Popsali také pozitivní vztah  $(S_c/S)/D_L$  a

$g_m$  a negativní vztah  $g_m/(S_c/S)$  a  $T_{cw}$  ( $S_c/S$  = povrch chloroplastů vystavených mezibuněčnému prostoru;  $T_{cw}$  = tloušťka buněčné stěny) Také podle dalších studií mohou být  $T_{cw}$  nebo membrány chloroplastů značně limitujícím faktorem pro  $g_m$  (Terashima et al., 2011). V klasických modelech je většinou zanedbáván třetí, laterální, rozměr listu, avšak s ohledem na to, že otevřené průduchy zabírají na ploše listu pouze 0,5-1,5 % (Wilmer and Fricker 1996) jsou někteří vědci toho názoru, že difuze  $CO_2$  mezibuněčnými prostory jsou (obzvláště u hypostomatických rostlin) příliš zjednodušována (Parkhurst, 1994; Morison and Lawson, 2007).

Jak ale bylo již napsáno, mezofylová vodivost je dynamická proměnná, která je variabilní v závislosti na environmentálních podmínkách a může se měnit v reakci na abiotické i biotické podmínky růstu (Flexas et al., 2008). Již dlouho je znám pokles  $g_m$  v reakci na vodní stres (Jones, 1973), na nízkou dostupnost dusíku (Evans and Terashima, 1988), vysokou nadmořskou výšku (Vitousek et al., 1990) nebo na salinitu (Bongi and Loreto, 1989). Byl prokázán i vliv aplikace kyseliny abscisové (Flexas et al., 2006a) nebo virové infekce (Sampol et al., 2003). Vztah mezi intenzitou ozáření (PPFD, hustota toku fotonů vlnové délky 400-700nm) a změnou koncentrace  $CO_2$  není zcela jistý. Existují práce popírající tento vliv (Tazoe et al., 2009) i práce poukazující na tento vliv. Skupina kolem Flexase (2007) prováděla měření vlivu  $g_m$  na  $C_i$ . Z jejich výsledků vyplývá, že se zvyšující se  $C_i$  klesá  $g_m$ . Tento výsledek byl naměřen u více rostlinných druhů (*Arabidopsis thaliana*, *Limonium gibertii*, *Nicotiana tabacum*, *Vitis berlandieri* × *Vitis rupestris*, *Cucumis sativus*, *Olea europaea*). Provedli také měření s mutanty tabáku se zvýšenou expresí aquaporinu NtAQP1, s non-sense mutací a s kontrolními rostlinami a opět zjistili nepřímou závislost  $g_m$  na  $C_i$ . K obdobnému výsledku došli i During (2003) a Vrábl a kol. (2009). Rozdílné výsledky by mohly být způsobené metodikou výpočtu  $g_m$ . Tholen a Zhu (2011) vypracovali 3D model difúzních reakcí, brali tedy v úvahu i vzájemnou prostorovou blízkost a interakci chloroplastů a mitochondrií. Do výpočtu  $g_m$  zahrnuli složku (foto)respirace, při níž se zvyšuje koncentrace  $CO_2$  v blízkosti chloroplastů. Podle tohoto modelu je  $g_m$  na koncentraci  $CO_2$  citlivá avšak ne tak výrazně jak ukazuje Flexas (2007) nebo Vrábl (2009).

Jelikož je  $g_m$  dynamická veličina, musí existovat nějaký regulační mechanismus. Jsou zde zřejmě přítomny přenašeče pro  $CO_2$ , čemuž nasvědčuje reakce  $g_m$  na změnu teploty. Pokud by zde žádné přenašeče nebyly a  $CO_2$  by bylo přenášeno pouze prostou difúzí, pak by teplotní koeficient ( $Q_{10}$ ) pro  $g_m$  byl blízký koeficientu difúze  $CO_2$  ve vodě (tedy 1,25 při 25°C). Bernacchi a kol. (2002) měřili teplotní závislost mezofylové vodivosti a vypočetli hodnotu  $Q_{10}$

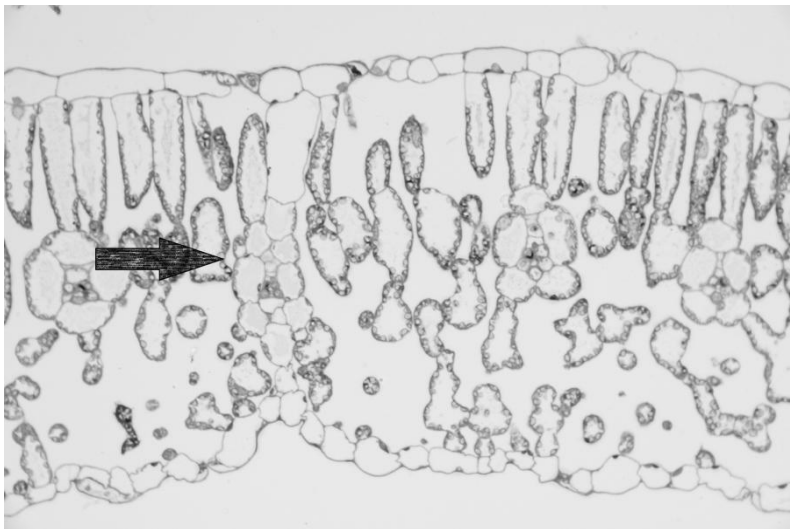
(v rozmezí 10°C až 35°C) 2,2. Diskutuje se o dvou možných přenašečích: anhydráze kyseliny uhličitě (CA) usnadňující přenos CO<sub>2</sub> do chloroplastů (Tsuzuki et al., 1985), nebo aquaporinech zvyšujících propustnost buněčných membrán pro CO<sub>2</sub> (Terashima and Ono, 2002).

Je tedy evidentní, že  $g_m$  (tj.  $g_{liq}$ ) není konečně daná, ale mění se jak v delším časovém měřítku (dny, týdny), tak v rychlých reakcích (minuty, hodiny) v závislosti na mnoha enviromentalních proměnných, např. světle, teplotě, dostupnosti vody a koncentraci CO<sub>2</sub>. Tím je rostlina schopná regulovat proces fotosyntézy v reakci na prostředí. Nicméně mechanismům, které za těmito reakcemi stojí, doposud plně nerozumíme (Neuwirthová 2012).

#### Mezofylová vodivost pro CO<sub>2</sub> v plynné fázi, $g_{ias}$ :

Oxid uhličitý musí difundovat z podprůduchové dutiny klikatými cestičkami mezibuněčného prostoru až k povrchu buněk absorbujících sluneční záření. Většina rostlin má listy hypostomatické, tedy s průduchy pouze na spodní straně listu, takže CO<sub>2</sub> musí doputovat přes celou jeho tloušťku až k vrchní vrstvě buněk palisádového parenchymu (Evans and vonCaemmerer, 1996). Difuzní odpor pro CO<sub>2</sub> může být **i**) v horizontálním směru, tedy s omezenou laterální difuzí, nebo **ii**) ve vertikálním směru, s omezenou difuzí napříč listem.

i) **Laterální difuze:** Některé rostliny mají výběžky cévních svazků až k oběma pokožkám, a vytváří tak fyzickou bariéru pro laterální difuzi plynů uvnitř listu. Tím se vytváří oddělené kompartmenty „obsluhované“ co do výměny plynů vlastní skupinou průduchů



**Obr. 2:** Polotenký řez listem heterobarické rostliny slunečnice roční (*H. annuus*). Šipka označuje výběžek cévních svazků zasahující k oběma pokožkám, který tak vytváří hermeticky izolované kompartmenty. Příprava vzorku viz Materiál a metody.

a hermeticky izolované od vedlejších kompartmentů. Takový list se nazývá heterobarický (příkladem heterobarických rostlin jsou vinná réva, *Vitis vinifera*; řepěň durkoman, *Xanthium strumarium* nebo slunečnice, *Helianthus annuus*, viz obr. 2). Většina rostlin úplné bariéry nevytváří, jsou tedy homobarické. V případě nerovnoměrné

průduchové vodivosti může přítomnost kompartmentů vést k nejednotné koncentraci  $\text{CO}_2$  v listu (Terashima, 1992).

- ii) **Vertikální difuze:** U amfistomatických rostlin (s průduchy na obou stranách listu) je možné měřit  $C_i$  v podprůduchových dutinách odděleně na adaxiální a abaxiální straně listu. Rozdíl v těchto hodnotách je závislý na rychlosti fotosyntézy a velikosti  $g_s$  a také na míře rychlosti difuze  $\text{CO}_2$  napříč listem. U takovýchto měření, při koncentraci  $\text{CO}_2$   $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  ve vnější atmosféře, byl nalezen rozdíl v  $C_i$  mezi adaxiální a abaxiální stranou listu  $0\text{-}20 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Mott and Oleary, 1984; Wong et al., 1985a; b; Parkhurst et al., 1988). Další možný způsob měření  $g_{ias}$  je porovnání výměny plynů ve vzduchu a v heloxu (atmosféra, kde je dusík nahrazen heliem). Difuze v heloxu je 2,3x rychlejší než ve vzduchu, takže  $g_{ias}$  je v takové atmosféře větší. Vyšší vodivost vede k navýšení rychlosti fotosyntézy při stejném  $C_i$  v podprůduchové dutině (Parkhurst and Mott, 1990). Šantrůček a kol. (nepublikovaná data) vyvinul způsob výpočtu  $g_{ias}$  založený na izotopové frakcionaci uhlíku.

### 1. 1. 3 Stabilní izotopy uhlíku $^{12}\text{C}$ a $^{13}\text{C}$

Izotop je z definice nuklid v rámci souboru nuklidů jednoho chemického prvku. Jádra všech izotopů daného prvku obsahují stejný počet protonů, ale liší se počtem neutronů. Mají tedy stejné atomové číslo, ale liší se hmotovým číslem a tím i atomovou hmotností. Tyto izotopy mohou být buď stabilní (jejich poločas rozpadu je delší než  $10^{18}$  let) anebo radioaktivní (jádra těchto izotopů se samovolně rozpadají a emitují při tom radioaktivní záření).

V atmosféře se vyskytuje 98,89 % uhlíku ve formě izotopu  $^{12}\text{C}$  a zbylých 1,11 % ve formě těžšího izotopu  $^{13}\text{C}$ . První publikace popisující nižší obsah těžšího uhlíku v rostlinných tkáních (v poměru k neorganickým materiálům jako je vápenec) pocházející již z roku 1939 byla napsána fyziky Nierem a Gulbransenem. Cesta odhalení příčiny tohoto ochuzení nebyla jednoduchá, předcházelo mu zdokonalení analytických technik a také objev  $\text{C}_4$  a CAM typů fixace uhlíku (Kortscha et al., 1965; Hatch and Slack, 1966). Koncem 70-tých let již bylo jisté, že k ochuzení dochází především během karboxylační reakce, ale částečně také vlivem difúze  $\text{CO}_2$  přes průduchy a dále skrz mezofyl až do chloroplastů. Farquhar a kol. (1982) ukázal na korelaci izotopového poměru s koncentrací  $\text{CO}_2$  v mezibuněčných prostorech, a že míra ochuzení souvisí s environmentálními podmínkami. Toto zjištění otevřelo mnoho možností využití v oborech fyziologie, ekofyziologie nebo agronomie.

Během cesty oxidu uhličitého z atmosféry až do chloroplastů se mění poměr forem  $^{13}\text{CO}_2$  a  $^{12}\text{CO}_2$ , dochází tedy ke změně izotopového signálu. Obsah jednotlivých izotopů je měřitelný, označuje se řeckým písmenem  $\delta$ , vyjadřuje množství izotopu  $^{13}\text{C}$  vzhledem ke standardu a udává se v promilích (viz rovnice 2) (Urey, 1948).

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_{\text{vzorek}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \cdot 1000 (\text{‰}) \quad \text{Rovnice 2}$$

Izotopový poměr může být vyjádřen také jako velká delta  $\Delta$ , která vyjadřuje změnu izotopového signálu v produktu (tedy rostlině) oproti výchozímu substrátu (tedy atmosféře). Oproti  $\delta$ ,  $\Delta$  není odvozená od standardu. Známe-li hodnoty  $\delta$  rostliny a atmosféry, můžeme vypočítat  $\Delta$  podle vztahu (Farquhar and Lloyd 1993):

$$\Delta = \frac{\delta_a - \delta_p}{1 + \delta_p} \quad \text{Rovnice 3}$$

V případě rovnice 3 jsou  $\delta$  brány jako poměrná čísla, a ne promile.

Tato změna je způsobena **i) kinetickou izotopovou frakcionací  $\text{CO}_2$  během difuze**; molekuly  $\text{CO}_2$  se dostávají z atmosféry dovnitř listů difuzí skrz průduchy, těžší molekuly difundují pomaleji než lehčí, což způsobuje ochuzení v množství  $^{13}\text{CO}_2$ , které se dá vyčíslit frakcionačním faktorem  $\varepsilon_a = 4,4 \text{ ‰}$  (Oleary et al., 1981). V případě difuze v hraniční vrstvě je vlivem laminárního proudění frakcionační faktor menší, podle empirického měření je  $\varepsilon_h = 2,9 \text{ ‰}$ .

**ii) k malé frakcionaci dochází také během rozpouštění  $\text{CO}_2$  ve vodě nutné pro transport skrz buněčnou stěnu** ( $\varepsilon_s = 1,1 \text{ ‰}$ ) a **při difuzi uvnitř buňky** ( $\varepsilon_w = 0,7 \text{ ‰}$ ) (Oleary et al., 1981)

**iii) kinetickou izotopovou frakcionací během fotosyntetické fixace  $\text{CO}_2$** ; enzym Rubisko (ribuloza-1,5-bisfosfát karboxyláza oxygenáza) zprostředkovává ve stromatu chloroplastů navázání molekuly  $\text{CO}_2$  na pětiuhlíkatý cukr ribuloza-1,5-bisfosfát. Vlivem jednoho neutronu navíc má  $^{13}\text{CO}_2$  menší pravděpodobnost nasednutí do reakčního centra Rubisko a produkt je proto ochuzen o  $^{13}\text{C}$  s faktorem  $29 \text{ ‰}$  ( $\varepsilon_b = 29 \text{ ‰}$ ). Tento způsob karboxylace je přítomen u tzv.  $\text{C}_3$  rostlin, ale i u nich je přibližně 10% uhlíku získáno pomocí jiného karboxylačního enzymu, nazývaného fosfoenolpyruvát karboxyláza (PEPC). Ten má frakcionační faktor mnohem menší, kolem  $2 \text{ ‰}$ , a proto je někdy při výpočtech diskriminace uhlíku v  $\text{C}_3$  rostlinách používána průměrná vážená hodnota frakcionačního faktoru fotosyntetické karboxylace  $\varepsilon_R = 27 \text{ ‰}$  ( $\varepsilon_R = 30 \text{ ‰} \cdot 0,9 + 2 \text{ ‰} \cdot 0,1 = 27,2 \text{ ‰}$ ) (Oleary 1993).

Tento frakcionační faktor není vůbec, nebo jen minimálně závislý na koncentraci CO<sub>2</sub>, pH (Roeske and Oleary, 1984) nebo na teplotě (Christeller et al., 1976). Přesto je variabilita diskriminace mezi rostlinnými druhy i mezi jedinci značná. Vogel (1980) porovnal 351 rostlinných druhů, u C<sub>3</sub> rostlin byla naměřena δ<sup>13</sup>C v rozpětí -22 ‰ a -34 ‰, u C<sub>4</sub> rostlin to byly hodnoty -9 ‰ až -16 ‰.

Tyto rozdíly byly již v 80-tých letech přisouzeny odrazu vnějšího prostředí, které ovlivňuje koncentraci oxidu uhličitého uvnitř listu (C<sub>i</sub>). Farquhar, Oleary a Berry (1982) odvodili vztah mezi Δ a poměrem C<sub>a</sub> (koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře) ku C<sub>i</sub> (rovnice 4).

$$\Delta^{13}\text{C} = a \cdot \frac{C_a - C_i}{C_a} + b \cdot \frac{C_i}{C_a} \quad \text{Rovnice 4}$$

Výsledná rovnice nese tyto předpoklady: Vnitřní transportní vodivost listu pro CO<sub>2</sub> je nekonečně velká (a tedy koncentrace CO<sub>2</sub> v intercelulárních prostorech C<sub>i</sub> je stejná s koncentrací v místě karboxylace uvnitř chloroplastů C<sub>c</sub>); vodivost hraniční vrstvy vzduchu nad listem je velká a C<sub>a</sub> je proto velmi blízká koncentraci na povrchu listu C<sub>s</sub>; příspěvek fotorespirace a respirace k izotopové diskriminaci je zanedbatelný. Z rovnice 4 je tedy zřejmé, že odchylka (Δ) v izotopovém složení uhlíku mezi atmosférou okolo listu a asimiláty (např. celulózu) je závislá na jediném fyziologickém parametru, a to na koncentraci CO<sub>2</sub> uvnitř listu. Místo celulózy jsem v této práci použila kutikulární membrány a epikutikulární vosky izolované z opačných stran hypostomatických listů a stanovovala jsem v nich zastoupení stabilních izotopů uhlíku jako ukazatel rozdílu v koncentraci CO<sub>2</sub> napříč listem (viz metody).

## 1. 2 Kutikula, její struktura a funkce

Většina epidermálních buněk nadzemních částí vyšších rostlin (tedy listy, plody, nezdřevnatělé stonky) jsou pokryty souvislou extracelulární membránou tvořenou rozpustnými a polymerizovanými lipidy zvanou kutikula nebo kutikulární membrána. Kutikula bývá také často nazývána „rostlinnou kůží“ a také původ slova vychází z latinského *cuticula*, tedy „tenká kůže“ (Heredia, 2003). Vývoj kutikuly je spojen se začátkem kolonizace souše rostlinami. Společně s evolucí průduchů, mezibuněčného prostoru ve fotosyntetizujícím mezofylu a vývojem floému a xylému umožňuje rostlinám existenci v homoiohydrickém stavu (Edwards, 1993). Nejstarší paleobotanické záznamy o výskytu kutikuly pochází z přelomu svrchního siluru a spodního devonu, tedy z období před přibližně 400 mil. let (Ewbank et al., 1996).

Funkce kutikuly jsou rozličné, pomáhá předcházet jak abiotickému, tak biotickému stresu. Avšak někdy jdou zájmy rostliny proti sobě. Mezi hlavní funkce kutikuly patří:

*Kontrola transpirace vody* – Přejít rostlin na souš byl podmíněn vývojem kutikuly a je s ní tedy spojena možnost terestrického způsobu života. Pro rostlinnou existenci je esenciální udržovat v tkáních turgor, tedy udržovat rovnováhu mezi ztrátou vody transpirací a příjmem vody kořeny. Transpirace nadzemních rostlinných orgánů je limitována kutikulou a řízena průduchy (Schonherr and Merida, 1981; Riederer, 1991; Kerstiens, 1996; Schreiber and Riederer, 1996).

*Kontrola výměny plynů* – Pokud jsou průduchy zavřené (což se děje v průměru 12 hodin denně), kutikula omezuje ztrátu a příjem plynů mezi rostlinou a atmosférou. To platí nejen pro vodní páru, ale také pro plyny jako jsou oxid uhličitý, kyslík, anorganické plynné polutanty a těkavé organické látky jako terpeny (Lendzian and Kerstiens, 1991; Kerstiens et al., 1992). V případě silně lipofilních organických výparů je preferovaná cesta skrz kutikulu i v době otevřených průduchů (Riederer 1995).

*Transport lipofilních látek* – Přes kutikulu se transportují lipofilní organické látky mezi nadzemními částmi rostlin a atmosférou. Všechny lipofilní sloučeniny s nízkou těkavostí musí být transportovány skrz kutikulu. Cesta skrz průduchy je buď velmi omezená, nebo dokonce nemožná (Buchholz and Schonherr, 2000).

*Odpuzování vody a nečistot* – Vrstvička vody na povrchu listu může mít negativní vliv na rostlinu; může skrze ni docházet k úniku iontů a polárních organických látek, také vytváří



ideální prostředí pro kolonizaci mikrobu typu fytopatogenních bakterií nebo parazitických hub (Kolattukudy et al., 1987). Avšak rostliny mají typicky nesmáčivou kutikulu, která vodu odpuzuje (minimalizuje styčnou plochu mezi listem a vodou), přispívá k rychlému uschnutí listu (Holloway, 1969; Barthlott and Neinhuis, 1997) a zabraňuje infiltraci vody do listu.

*Ochrana proti vysoké intenzitě záření* – Fotosyntetický aparát vyšších suchozemských rostlin využívá sluneční záření zhruba v oblasti 400-700 nm, nicméně celý aparát je velmi citlivý na nadměrné ozáření. Jedním z ochranných mechanismů je hustá vrstva epikutikulárních vosků tvořících krystaly, které zvyšují rozptyl a odraz dopadajícího záření. Dále se rostliny potýkají s dopadem UV záření, tedy radiace o vlnových délkách 280-400 nm. Přítomnost kutikuly je jedním z mechanismů, jak se s tímto stresovým faktorem vypořádat, protože kutikula obsahuje látky absorbující UV záření (Krauss et al., 1997; Baur et al., 1998; Long et al., 2003; Kolb and Pfundel, 2005).

*Mechanická ochrana* – V některých případech mechanické vlastnosti kutikuly zpevňují další struktury jako buněčnou stěnu. Jedná se například o kutikulu plodu rajčete nebo třešně (Matas et al., 2004).

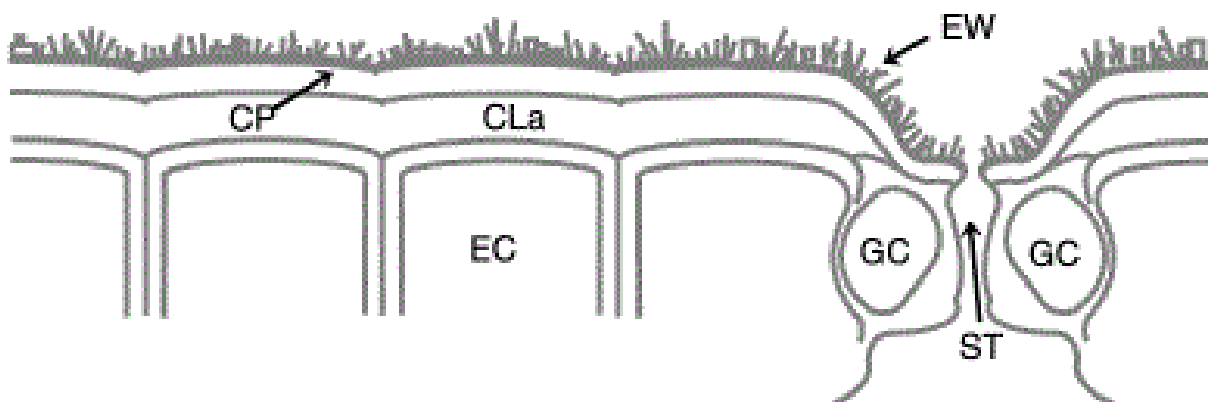
*Úloha při vývoji rostlin* – Kutikula hraje zásadní roli při vývoji rostliny. U mutantů s defektním vývojem kutikuly docházelo k morfologickým abnormalitám jako spojení orgánů (Lolle et al., 1998).

*Místo biotických interakcí* – povrch kutikuly vyšších rostlin (fylosféra) je místem většiny nadzemních interakcí s mikroskopickými organismy (tedy s bakteriemi, kvasinkami či houbami). Vlastnosti kutikuly ovlivňují přilnavost organismů, rozpoznání a kolonizaci fylosféry či dostupnost živin a vody. V případě patogenů poskytuje kutikula naopak mechanickou ochranu proti jejich invazi (Mendgen et al., 1996; Serrano et al., 2014).

### **1. 2. 1 Struktura rostlinné kutikuly**

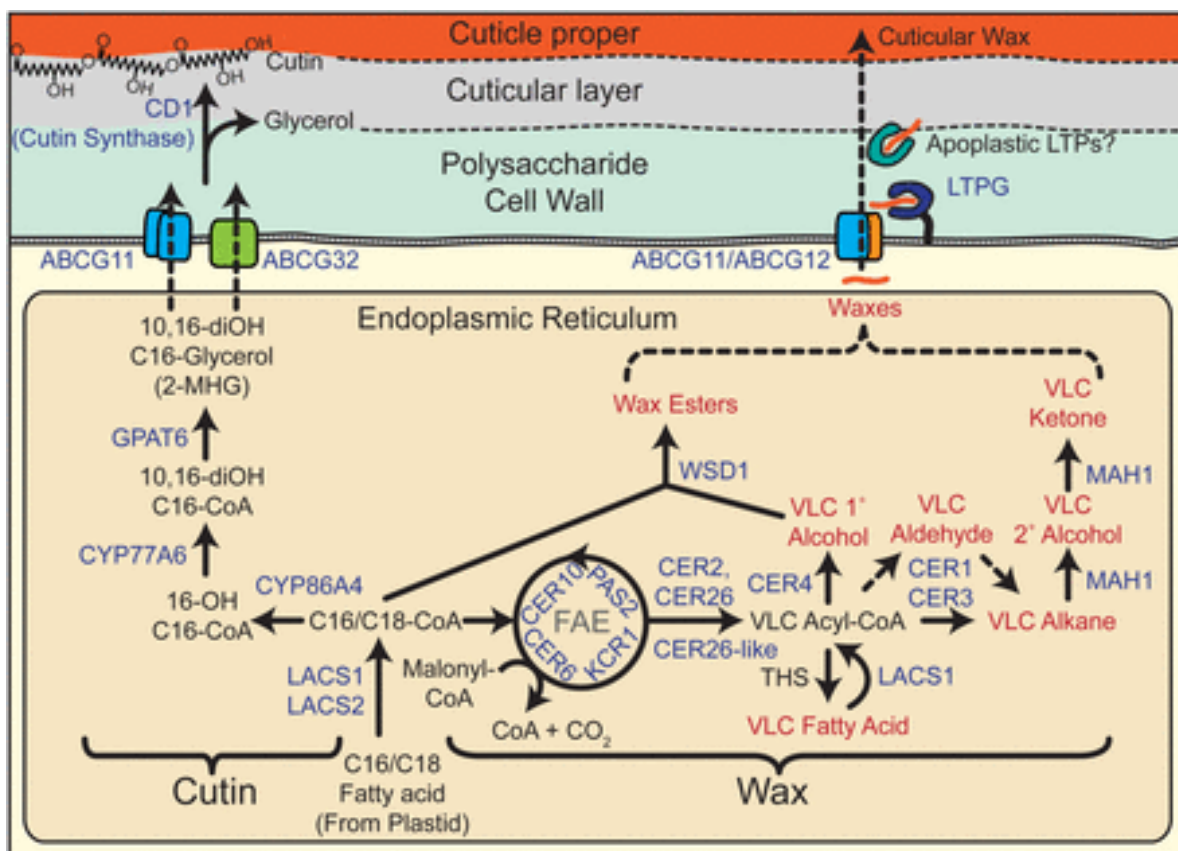
Kutikula je extracelulární produkt epidermis tvořící průhledný film sestávající z polymerních esterů, lipidů a amorfních a krystalických vosků (Samuels et al., 2008). Na listu najdeme kutikulu na jeho adaxiální (svrchní) i abaxiální (spodní) straně. Kutikula lemují průduchovou štěrbinu a zasahuje také do podprůduchové štěrbin, kde pokrývá volné epidermální buňky (ale nikoliv mezofyl) (Osborn and Taylor, 1990).

Podle struktury můžeme kutikulu rozdělit na dvě části: 1. vrstva překrývající buněčné stěny epidermis (Cuticular Layer) bohatá na kutin a monomery glycerolu a je doplněna intrakutikulárními vosky; 2. vrstva překrývající kutikulární matrix tvořená epikutikulárními vosky (Cuticle Proper; viz obr. 3) (Yeats and Rose, 2013).



**Obr. 3:** Struktura rostlinné kutikuly. Schematický diagram znázorňující buněčnou stěnu a na ni jednotlivé složky kutikuly – epikutikulární vosky (EW); vlastní kutikulu (cuticle proper - CP) obsahující epi- a intrakutikulární vosky a kutin; kutikulární vrstvu (Cuticular layer CLa) skládající se z intrakutikulárních vosků, kutinu a polysacharidů; epidermální buňky (EC); svěrací buňky (GC) a průduchový pór (ST) (Shepherd and Griffiths, 2006)

Kutin tvoří 40 až 80% celkové hmotnosti kutikuly, z chemického hlediska jde o síť oxidovaných  $C_{16}$  a  $C_{18}$  mastných kyselin spojených esterovou vazbou, podstatnou složkou mohou být také glycerol a dikarboxylové kyseliny (Nawrath, 2006). Tyto esterové vazby mohou být jednoduše rozrušeny například saponifikací. Jednotlivé monomery jsou nejčastěji tvořeny  $\omega$ -hydroxykyselinami, často s jednou či dvěma přidanými hydroxyl nebo epoxy skupinami uprostřed uhlíkatého řetězce. Přestože je ve složení monomerů kutinu v rámci rostlinné říše jistá variabilita, je velká část biosyntetické dráhy totožná (Yeats and Rose, 2013). Biosyntéza začíná de novo syntézou mastných kyselin v plastidech epidermálních buněk (viz obr. 4). Ty jsou pak transportovány do ER, kde se nachází další tři kroky syntézy: syntéza acyl-CoA,  $\omega$ -hydroxylace a hydroxylace střední části uhlíkatého řetězce. Přesné pořadí reakcí není zatím známo, avšak  $\omega$ -hydroxylace pravděpodobně předchází další hydroxylaci (Li-Beisson et al., 2009).



**Obr. 4:** Schéma syntézy kutikulárních vosků a kutinu. Modře jsou popsány geny zahrnuté v dané dráze, červeně jsou označeny produkty typicky se vyskytující ve směsi kutikulárních vosků (Yeats and Rose, 2013)

Nasyntetizované prekurzory kutinu (stejně jako vosků) musí být exportovány z ER přes plazmatickou membránu a polysacharidovou buněčnou stěnu až do vytvářející se kutikulární membrány. Mechanismus tohoto transportu je prozatím málo prozkoumaný, avšak ví se, že transportu vosků i prekurzorů kutinu přes plazmatickou membránu se účastní ABC transportéry (Pighin et al., 2004; Bird et al., 2007).

Poslední fází syntézy kutinu je polymerace monomerů. Molekulární mechanismus není stále objasněn, doposud byl identifikován jeden protein z GDSL rodiny (GDSL-motif lipase/hydrolase), který se nachází ve vyvíjející se kutikule (Yeats et al., 2012). Tento protein je kódován genem *CD1*. Mutanti rajčete *cutin deficient1 (cd1)* s potlačenou expresí v tomto genu vykazují fenotyp s nižším obsahem polymerizovaného kutinu v kutikule plodu (Isaacson et al., 2009). Přestože nebyly nalezeny žádné alely tohoto genu, *cd1* mutanti nejsou kompletně deficientní v polymeru kutinu, což naznačuje přítomnost dalších syntázy nebo jiné neenzymatické dráhy (Yeats and Rose, 2013)

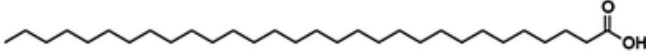
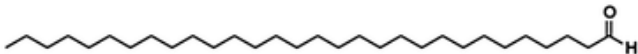
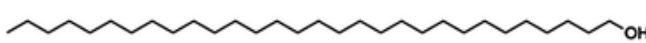
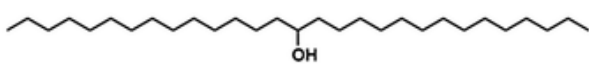

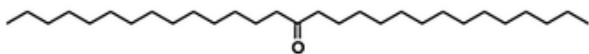
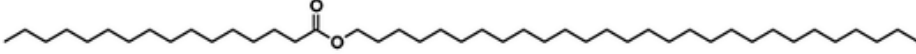
U některých druhů lze najít navíc další lipidický polymer, nazývaný kutan. Jeho monomery jsou spojené neesterovou vazbou a na rozdíl od kutinu je odolnější na depolymeraci. Také je bohatší na ether a C-C vazby (Gupta et al., 2006). U některých rostlin se kutan nevyskytuje vůbec, avšak mnoho jiných má oba tyto biopolymery v různých poměrech v závislosti na vývojové fázi kutikuly (Tegelaar et al., 1991). Také se zdá, že přítomnost kutanu v kutikule má souvislost s adaptací rostlin k suchu (Boom et al., 2005).

Kutikulární vosky jsou přítomny v celé šíři kutikuly, část se tedy nachází přímo v polymerickém matrix kutinu – jde o tzv. intrakutikulární vosky, které jsou v mechanicky rezistentní vrstvě kutinu, část se nachází na vnější straně polymeru, odkud mohou být mechanicky odstraněny – nazýváme je extra- nebo epikutikulárními vosky (Buschhaus and Jetter, 2011). Na rozdíl od kutinu jsou tvořeny širší škálou uhlíkatých sloučenin s různě dlouhými řetězci nebo kruhovými strukturami (Jetter et al. 2006, Walton 1990). Z definice se jedná o hydrofobní sloučeniny na povrchu rostlin, které mohou být odstraněny ponořením do organického rozpouštědla jako je chloroform nebo hexan (PostBeittenmiller, 1996). V této směsi sloučenin mají přední místo alifatické, plně satureované uhlovodíkové řetězce o délce alespoň 20 uhlíků. Tyto sloučeniny s velmi dlouhými řetězci (VLC) jsou syntetizovány elongací mastných kyselin C<sub>18</sub> až po délku řetězce 34 a následně modifikovány v alkany, aldehydy, ketony, primární a sekundární alkoholy, nebo estery vzniklé syntézou mastných kyselin a alkoholů (Samuels et al., 2008). Přehled nejhojnějších alifatických uhlovodíků obsažených ve směsi kutikulárních vosků je v tabulce č. 1 (Yeats and Rose, 2013). Druhou skupinu hojně zastoupenou v kutikule tvoří pentacyklické triterpenoidy, v malém množství mohou být ve směsi vosků nalezeny také aromatické sloučeniny (Jetter et al. 2006). Epikutikulární vosky mohou tvořit mikrokrystaly, viditelné pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Tyto krystaly se vyskytují v mnoha morfologických formách, které klasifikoval Barthlott a kol. (1998). Morfologie vosků může být ovlivněna teplotou, intenzitou světla a vlhkostí (Shepherd and Griffiths, 2006). Chemické složení kutikulárních vosků je druhově specifické, navíc se může lišit na různých orgánech, tkáních či v závislosti na vývojovém stádiu (PostBeittenmiller, 1996).

### 1. 2. 2 Syntéza vosků

Syntéza vosků začíná u *de novo* syntézy C<sub>16</sub> nebo C<sub>18</sub> mastných kyselin ve stromatu plastidů epidermálních buněk (viz obr. 4). Tyto mastné kyseliny s dlouhým uhlíkovým řetězcem jsou následně přeměněny acyl-koenzym A syntázou (LACS) na CoA thioestery a jsou okamžitě transportovány do endoplazmatického retikula (ER) (Schnurr et al., 2004). C<sub>16</sub> acyl-CoA je následně substrátem pro komplex elongázy mastných kyselin (FAE), která se skládá ze čtyř enzymů: β-ketoacyl-CoA syntázy (KCS), β-ketoacyl-CoA reduktázy (KCR), β-hydroxyacyl-CoA dehydratázy (HCD) a enoyl-CoA reduktázy (ECR) (Haslam and Kunst, 2013). Postupným připojováním uhlíku (vždy jsou přidány dva atomy uhlíku za jeden cyklus) vznikají saturevané mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA) (Xu et al., 2002; Kunst and Samuels, 2003; Yeats and Rose, 2013).

**Tab. 1:** Hlavní acyl-lipidické chemické skupiny vyskytující se ve směsi kutikulárních vosků. Většina skupin se vyskytuje v homologních sériích s různě dlouhými uhlíkatými řetězci. V tabulce jsou ukázány typicky vyskytující se sloučeniny s průměrnou délkou uhlíkatého řetězce (Yeats and Rose, 2013)

Class of acyl lipid cuticular wax	Generic structure
Fatty acid	
Aldehyde	
Primary alcohol	
Secondary alcohol	
Alkane	
Ketone	
Wax ester	

Vzniklé VLCFA jsou následně použity pro syntézu dalších sloučenin vosků. U většiny rostlin (včetně *Arabidopsis*) můžeme oddělit dvě biosyntetické dráhy: 1. dráha produkující alkoholy, v rámci které vznikají kromě primárních alkoholů také estery; 2. dráha formující alkyany, která dává vzniknout mimo alkyany také aldehydům, sekundárním alkoholům a ketonům (Kunst and Samuels, 2003; Samuels et al., 2008).

Odvození primárních alkoholů z prekurzorů VLCFA je zprostředkována acyl-CoA reduktázou mastných kyselin (FAR) (Vioque and Kolattukudy, 1997). Posledním krokem acyl redukční dráhy je syntéza esterů, která je katalyzována acyl-CoA mastnou kyselinou:acyltransferázou mastných alkoholů (syntáza esterů, wax ester synthase WS) (Kunst and Samuels, 2003).

Druhou dráhou, tedy dráhou formující alkany, se za posledních 20 let zabývala celá řada odborníků a vědeckých pracovišť. Biochemické analýzy prováděny skupinou vědců kolem Kolattukudyho (Cheesbrough and Kolattukudy, 1984; Dennis and Kolattukudy, 1991) přinesly důkazy o dvoustupňové cestě syntézy zahrnující konverzi acyl-CoA na mastné aldehydy a následnou dekarboxylaci mastných aldehydů na alkany. Tato hypotéza vycházela z pozorování přeměny C<sub>18</sub> aldehydu na C<sub>17</sub> alkan za uvolnění oxidu uhelnatého u hrachu (*Pisum sativum*) a u zelené řasy (*Botryococcus braunii*). Tato dráha byla v roce 2010 popsána také u cyanobakterií (Schirmer et al., 2010). Této skupině vědců se podařilo izolovat a biochemicky charakterizovat geny kódující fatty acyl-ACP reduktázu (FAAR), která katalyzuje přeměnu VLCFA na odpovídající aldehyd, a aldehyd dekarboxylázu (AD) následně katalyzující konverzi na VLC alkany za uvolnění jednoho atomu C. Následně demonstrovali, že co-exprese těchto enzymů v *E. coli* byla dostatečná pro in vivo biosyntézu alkanů. Kutikulární alkany mohou být následně hydroxylovány na sekundární alkoholy a ty mohou být následně oxidovány na ketony (Kolattukudy, 1970).

Syntetizované vosky jsou potom exportovány do kutikuly (viz transport monomerů kutinu).

### 1. 3 Vývoj průduchů

Průduchy, neboli stomata, jsou další evoluční novinkou nutnou pro výstup rostlin na souš. Zatímco kutikula se může jevit jako málo dynamická, spíš pasivní bariéra pro ztrátu vody a zisk CO<sub>2</sub>, průduchy jsou dynamickou strukturou schopnou „odpojovat“ a „připojovat“ rostlinu k okolní atmosféře podle momentálního fyziologického stavu listu. Jedná se o mikroskopické útvary odvozené z epidermis, složené ze dvou specializovaných tzv. svěracích buněk obklopující průduchovou štěrbinu a regulujících její šířku (otevírání a zavírání). Tato funkce je podmíněna existencí sousedních, tzv. podpůrných buněk, které jsou u některých druhů morfologicky odlišné od ostatních epidermálních buněk. Souboru svěracích a podpůrných buněk, průduchové štěrbině a navazujících dutin uvnitř a vně štěrbin se říká průduchový aparát. Průduchy se vyskytují v celé rostlinné říši a najdeme je nejen na listech, ale na také na dalších rostlinných orgánech, které jsou v kontaktu s atmosférou (tedy na stoncích, květech či plodech). Množství a umístění průduchů je orgánově a rodově specifické, ale je také ovlivněno environmentálními faktory. Průduchy byly pozorovány na fosiliích starých přes 400 milionů let, přesto je jejich základní morfologie téměř uniformní. Avšak jejich velikost (šířka a délka svěrací buňky, hloubka průduchové štěrbině), množství (počet na jednotkové ploše listu) a uspořádání (vzdálenost od sebe a orientace) je velmi variabilní (Vaten and Bergmann, 2012). Z hlediska umístění průduchů na listu rostliny můžeme rozlišovat tři skupiny: i) **amfistomatické listy**, které mají průduchy na adaxiální (svrchní) i abaxiální (spodní) straně, např. *Arabidopsis thaliana*, *Lepidium sativum*, *Helianthus annuus* ii) **hypostomatické listy**, u nichž najdeme průduchy pouze na abaxiální straně, např. rody *Ficus*, *Hedera* a iii) málo časté **epistomatické listy**, nacházející se u vodních rostlin s na hladině plovoucími listy, které mají průduchy pouze na adaxiální straně; např. *Nymphaea sp.* (Procházka et al. 1998).

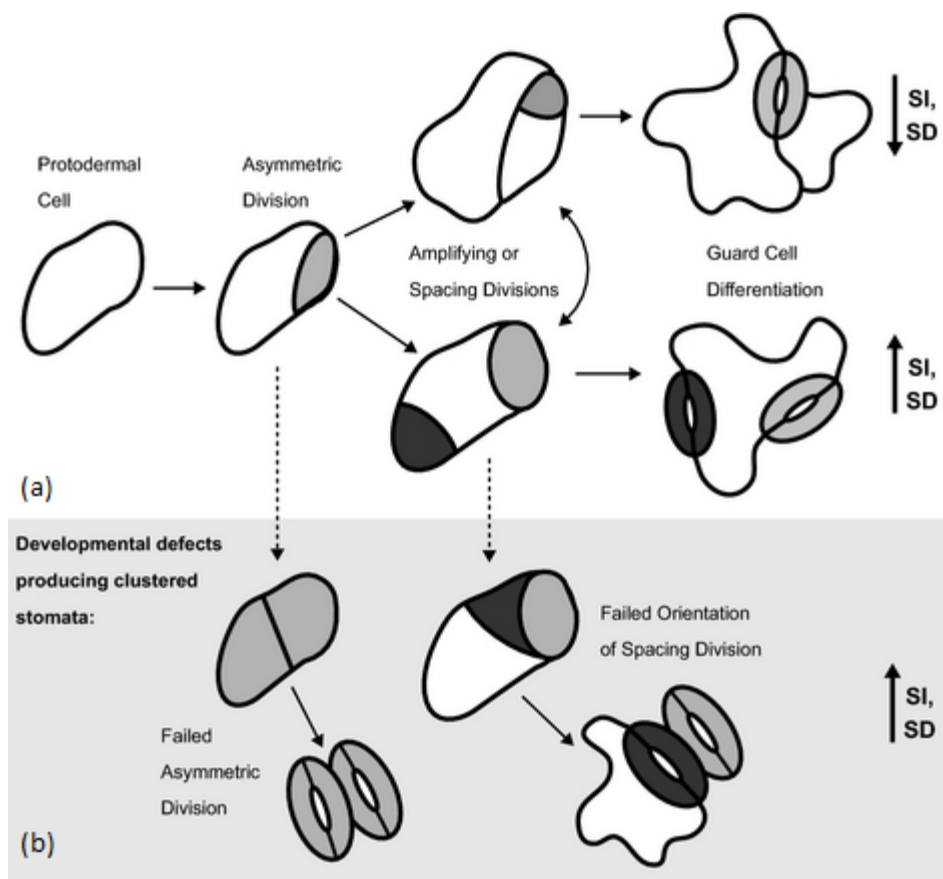
Funkcí průduchů je zprostředkovávat výměnu plynů mezi rostlinou a atmosférou, jedná se především o oxid uhličitý, kyslík a vodní páru. Jsou tedy pro rostlinu nepostradatelné, probíhá skrz ně transport CO<sub>2</sub> do podprůduchové dutiny a následně až do chloroplastu, kde je asimilován. Na druhou stranu ale dochází ke ztrátě vody, jejíž dostupnost je pro rostlinu často limitujícím faktorem. Proto se musí rostliny přizpůsobovat vnějšímu prostředí a reagovat na změny regulací stomatální vodivosti (Chaerle et al., 2005). Tu může rostlina měnit buď regulací velikosti (šířky) průduchové štěrbině, v rámci minut až hodin, v reakci na okamžitou změnu teploty, ozáření nebo nedostatek vody, nebo již při vývoji množstvím průduchů na jednotku

plochy listu (tzv. hustotou průduchů) a velikostí svěracích buněk (přizpůsobení se převládajícím klimatickým podmínkám). Přes snahu vědců se stále neví, co je klíčovým signálem určujícím hustotu průduchů (*stomatal density*; *SD*) a stomatální index (vyjadřuje poměr mezi počtem průduchů a počtem všech buněk v epidermis, tedy součtem dlaždicovitých buněk a průduchů; *stomatal index*; *SI*) u nově se vyvíjejících listů. Je však prokázáno, že tento signál je syntetizován v již fotosyntetizující tkáni a je transportován do nově se tvořících listů (Lake et al., 2001).

### 1. 3. 1 Vývoj průduchů

Vývojová linie průduchu začíná asymetrickým dělení postprotodermální buňky, tzv. mateřské buňky meristemoidu (*meristemoid mother cell*) za vzniku malé meristemoidní a větší sesterské buňky (viz obr. 5, meristemoid je obvykle v půdorysu trojúhelníkovitá buňka). V této fázi může dojít k dalšímu dělení sesterské buňky na dvě dlaždicovité (a tak snižovat *SD* a *SI*) nebo může dojít k vytvoření další meristemoidní buňky (a tím ke zvyšování *SD* a *SI*) (Geisler and Sack, 2002). Meristemoidy tedy mohou rozšířit, nebo naopak ukončit vývoj průduchů a tím přímo ovlivňují kapacitu pro výměnu plynů dospělého listu, potažmo celé rostliny (Dow and Bergmann, 2014). Meristemoidy musí projít následně dalšími dvěma vývojovými kroky: prvním je proměna trojúhelníkovitého meristemoidu na oválnou průduchovou mateřskou buňku (*guard mother cell*; GMC) a ta následně projde symetrickým dělením za vzniku dvou svěracích buněk a průduchové štěrby mezi nimi (Dow and Bergmann, 2014). Mimo množství průduchů je pro účinnou výměnu plynů klíčové také jejich rozmístění na listu. Skoro u všech rostlinných druhů bylo pozorováno vytvoření minimálně jedné dlaždicovité epidermální buňky mezi jednotlivými průduchy (nedochází tedy k jejich přímému kontaktu), jedná se o tzv. pravidlo jedné rozdělovací buňky, *one-cell spacing rule* (Geisler et al., 2000). Všechny kroky jsou podmíněny poměrně širokou škálou genů a transkripčních faktorů, jejichž přehled lze nalézt např. v review od Dow a Bargmannové (2014).





**Obr. 5:** Nákras vývojové linie průduchů u modelového organismu *A. thaliana*. (a) Nákras normálního dělení buněk vedoucí k odlišnému *SI* nebo *SD*; (b) Nákras dvou možných defektů při diferenciaci vedoucí ke špatnému rozmístění průduchů, tvorbě jejich klastrů v důsledku porušení pravidla minimálně jedné oddělovací buňky (*one-cell spacing rule*) (Dow et al., 2014).

### 1. 3. 2 Environmentální regulace hustoty průduchů

Je známo, že na vývoj listu mají vliv vnější podmínky, rostlina se snaží optimalizovat intenzitu výměny plynů, často za účelem zvýšení efektivity využití vody (*water use efficiency* - WUE) (Cowan 1977).

Z environmentálních faktorů ovlivňující množství průduchů v pokožce můžeme jmenovat teplotu listu, vlhkost vzduchu i půdy, kvalitu a kvantitu záření dopadajícího na list a koncentraci  $\text{CO}_2$  v atmosféře ( $C_a$ ). Existují zatím nepotvrzené důkazy o vlivu koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu ( $C_i$ ) namísto  $C_a$ , který by propojil jak vliv intenzity světla, tak vnější koncentraci  $\text{CO}_2$  (Santrucek et al., 2014). Samozřejmě zásadní roli mají také endogenní signály, především fytohormony [na příklad Saibo a kol. (2003) poukázal na roli giberelinu při vývoji hypokotylu *A. thaliana*].

Již poměrně dlouho je známo, že hustota ozáření (PPFD) má vliv jak na *SD*, tak na *SI* (bez porušení *one-cell spasing rule*) (Schoch et al., 1980). Dalších skoro 30 let se ale nevědělo, čím je tato reakce způsobena. V té době skupiny kolem Cassona (2009) a Boccalandra (2009) objevily, že tato změna je zprostředkována aktivací fotoreceptoru fytochromuB (phyB), který je přemístěn z cytoplasmy do jádra, kde může interagovat s fytochrom-interagujícími faktory (PIFs). PIFs je malá skupina bHLH transkripčních faktorů, které hrají roli právě ve vytváření některých odpovědí na světelné podmínky (Monte et al., 2007). Podle bádání skupiny Kang a kol. (2009) má také phyA důležitou roli při vývoji průduchů a to ve vnímání dlouhovlnné-červené složky spektra. Mutantní rostliny *phyA* vykazovali při růstu na dlouhovlnném-červeném světle fenotyp s průduchy, které zastavily vývoj v meristematické fázi.

Kromě fytochromů mají vliv na vnímání světelných podmínek také fotoreceptory v oblasti UV-A a modrého spektra záření, tedy kryptochromy CRY1 a CRY2 a fototropiny. Mutantní rostlinky *35Spro-CRY1* (tedy rostliny s overexpresí v genu pro CRY1) pěstované na modrém světle vykazovaly klastrovitý fenotyp a zvýšený *SI*. Epidermis děložních listů u dvojitého mutantu *cry1 cry2* pěstovaný na modrém světle vykazoval velké množství meristemoidických buněk, menší průduchy a snížený *SI* oproti jedincům pěstovaných na červeném nebo dlouhovlnném červeném světle (Woodward, 1987; Kang et al., 2009).

### **1. 3. 3 Vliv koncentrace oxidu uhličitého na vývoj průduchů**

Již v 80-tých letech minulého století byla pozorováno, že většina rostlinných druhů reaguje na zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> redukcí počtu průduchů na listu (Woodward, 1987) a tento vztah je pozorovatelný i do minulosti (měřeno u herbářových položek) a u fosilií (Beerling et al., 2002). Lake a Woodward (2008) také poukázali na výraznější reakci při vyšší vlhkosti. V protikladu k *SD*, která negativně koreluje s koncentrací CO<sub>2</sub>, velikost průduchů (počítaná jako délka svěracích buněk násobená šířkou páru svěracích buněk v uzavřeném stavu) koreluje s koncentrací CO<sub>2</sub> pozitivně, a to jak u fosilních měření, tak u rostlin pěstovaných v kontrolované atmosféře (Franks and Beerling, 2009). Při rostoucí koncentraci CO<sub>2</sub> tedy klesá četnost průduchů na nově vyvinutých listech, ale průduchy jsou větší.

Přestože je jasně viditelný vliv změny složení atmosféry, není stále jasné, jak je signál rostlinou vnímán a předáván nově se vyvíjejícím listům. Z genů regulujících průduchový vývoj v závislosti na koncentraci CO<sub>2</sub> je znám zatím pouze HIGH CARBON DIOXIDE (HIC) gen. Rostliny defektní v tomto genu vykazují při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> nezměněný *SI* (oproti

kontrolám, které za těchto podmínek *SI* snižují). Expres genu HIC je lokalizovaná ve svěracích buňkách a je homologní ke genu kódujícímu beta keto-acyl co-A syntázu zapojenou do syntézy dlouhořetězcových (VLC) mastných kyselin, tedy do syntézy kutikuly a kutikulárních vosků. Také dvě jiné mutace v syntéze kutikulárních vosků, *cer1* a *cer6*, vykazují obdobný fenotyp (Gray et al., 2000). Zdá se tedy, že rostliny s defektní kutikulou (co do propustnosti pro CO<sub>2</sub> a jiné plyny) ztrácí schopnost reagovat na změny v atmosférické koncentraci CO<sub>2</sub>. Bohužel od té doby nebyly publikovány žádné další zprávy, které by tyto výsledky podpořily nebo vyvrátily. Další velkou neznámou zůstává, jak je signál o vlastnostech prostředí přenášen z dospělých do nově se vyvíjejících listů. Lake a kol. (2002) pozorovali změnu fenotypu reagujícího na koncentraci CO<sub>2</sub> narušením dráhy syntézy kyseliny jasmonové. U mutantů *fad-4* defektních v genu LOX kódující lipoxygenázu, která katalyzuje přeměnu linolové kyseliny na kyselinu jasmonovou, nebyla pozorováno oproti kontrole snížení *SI* při zvyšující se *C<sub>a</sub>*. Druhým fytohormonem pravděpodobně zahrnutým do signální dráhy je etylen. *A. thaliana*, jejíž semena byla ošetřena ACC, tedy prekurzorem etylenu, vykazovala klastrovitý fenotyp (Serna and Fenoll, 1997). Berger a Altmann (2000) předpokládali, že etylen je spíše zapojen do správného vývoje celé epidermis, než přímo do vývoje průduchů. Jedna z přirozených vývojových reakcí na etylén je také inhibice buněčné expanze listů (Johnson and Ecker, 1998), což se neukazuje u *ein2* mutantu defektním v citlivosti na etylen. Proto může docházet ke snižování počtu epidermálních buněk na plochu a změně *SI* (Lake et al., 2002).

Je dobře známo, že svěrací buňky reagují na koncentraci CO<sub>2</sub> uvnitř listu (*C<sub>i</sub>*) spíše než na vnější koncentraci CO<sub>2</sub> (*C<sub>a</sub>*); průduchy se otevírají při poklesu *C<sub>i</sub>* a zavírají při jeho navýšení (Mott, 1988; Willmer, 1988; Mott, 2009). Skupina Šantrůček a kol. (2014) usuzuje, že analogicky ke krátkodobému účinku *C<sub>i</sub>* při pohybu průduchů, *C<sub>i</sub>* by mohlo regulovat také finální *SD* vyvinutých listů. Změny *C<sub>i</sub>* zde navodili odlišným PPF, *C<sub>a</sub>*, přidáním kyseliny abscisové kyseliny (ABA) nebo polyetylen glykolu (PEG) do substrátu a pěstováním rostlin v pozměněné atmosféře; *C<sub>i</sub>* integrované za dobu růstu následně vypočítali pomocí izotopového signálu δ<sup>13</sup>C v sušině podle Farquhar a kol. (1982). Výsledky těchto pokusů ukazují silnou korelaci mezi *C<sub>i</sub>* a *SD*.

Za možný signál přinášející informaci o vnějších podmínkách nově se vyvíjejícím listům může být považována ABA. Tento fytohormon je syntetizován v různých rostlinných orgánech, je mobilní a může být rychle přenášen skrz xylém v rámci celé rostliny (Heilmeyer et al., 2007).

Navíc ABA glukosylester (ABA-GE) byl označen jako potenciální signál na dlouhé vzdálenosti (Jiang and Hartung, 2008). Roli ABAy a celkové transpirace při vývoji průduchů vysvětlovali Lake a Woodward (2008) a v obsáhlém review Chater a kol. (2014).

## 2. Cíle práce

- i. Testovat hypotézu, že napříč hypostomatickým listem existuje gradient koncentrace CO<sub>2</sub>, který je detekovatelný z obsahu izotopu uhlíku <sup>13</sup>C v kutikule.
- ii. Ověřit kvalitativní/kvantitativní model diskriminace <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> uvnitř listu.
- iii. Vyhodnotit data z předchozí skríningové studie hypostomatických druhů rostlin.
- iv. Na vybraném modelovém druhu *Ficus elastica* zjistit vliv prostředí na anatomickou stavbu listu a transport CO<sub>2</sub> napříč listem.

## 3. Materiál a metody

### 3. 1 Rostlinný materiál

Pro skríningovou studii použito 15 druhů hypostomatických rostlin. Z listů každé rostliny jsem vysekla korkovrtem 5 listových terčků o průměru 14 mm pro měření tloušťky listu,  $d$  [mm], a množství listové sušiny na jednotku plochy,  $LMA$  [mg·cm<sup>-2</sup>]. Ze suché hmoty rozemletých listových terčků jsem také stanovovala  $\delta^{13}C$ . Z dalších 20 listových terčků jsem izolovala kutikulu a extrahovala vosky (viz dále). Seznam rostlinných druhů se zařazením do čeledí je uveden v tabulce P1 v příloze.

Pokusnou rostlinou pro detailní výzkum vlivu prostředí na anatomickou stavbu listu a transport CO<sub>2</sub> napříč listem byl zvolen fíkovník pryžodárný (*Ficus elastica*) z čeledi morušovníkovité (*Moraceae*). *F. elastica* je hypostomatická rostlina schopná růst v široké škále podmínek prostředí (ozáření a teploty) a je vhodná pro enzymatickou izolaci kutikul. Byli vybráni dva jedinci pěstovaní po několik let za odlišných environmentálních podmínek, které podle předpokladů měly navozovat rozdílnou rychlost fotosyntézy. Podmínky měly alespoň přibližně simulovat prostředí v podrostu a v horních patrech subtropického lesa, kde se rostlina vyskytuje přirozeně; proto jsem je označila jako variantu G (*Ground*) a variantu T (*Top*). **Varianta G** rostla za průměrné teploty ve dne/v noci 22/18°C v létě a 10/10°C v zimě, průměrná ozáření PAR (fotosynteticky aktivní radiace) byla naměřena v létě 9  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (s maximem 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), v zimě 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (s maximem 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). **Varianta T** rostla za průměrné teploty ve dne/v noci 26/22°C v létě a 19/17°C v zimě, průměrná ozáření PAR byla naměřena v létě 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (s maximem 572  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), v zimě 36  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (s maximem 206  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Tato data byla naměřena v létě pomocí otevřeného

gazometrického systému Li-6400 a Li-6400 XT (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), u varianty G probíhalo měření tři dny v červenci, u varianty T tři dny na začátku září. Pro zimní měření jsem použila datový záznamník Minikin (Brno, Česká Republika), měření probíhalo 14 dní. Průměrné teploty a ozáření byly počítány jako aritmetický průměr z měření v pětiminutových intervalech během celého dne. Růst ani jedné rostliny nebyl omezen dostupností živin.

Z každé varianty jsem použila tři listy, druhý (G\_2, T\_2), třetí (G\_3, T\_3) a sedmý (G\_7, T\_7) plně vyvinutý list (počítáno od vzrostného vrcholu rostliny). Pro každý list byla zaznamenána světelná křivka a  $A/C_i$  křivka, viz gazometrické měření. Maxima rychlosti fotosyntézy naměřené během měření  $A/C_i$  křivek byla 4,3-6,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  u varianty G a 9,4-12,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  u varianty T. Průběhy křivek pro jednotlivé listy jsou zobrazeny v grafu v příloze (obr. P1 a P2).

Po měření jsem z každého listu vysekla korkovrtem 8 terčků o průměru 4 cm, s plochou 12,56cm<sup>2</sup>, a 8 terčků o průměru 1,2 cm, s plochou 1,13cm<sup>2</sup>. Čtyři velké terčky jsem použila na kvantitativní a chemickou analýzu kutikulárních vosků, z dalších čtyř jsem měřila průduchovou hustou, průduchový index a obsah izotopu <sup>13</sup>C v kutikule a kutikulárních voscích. Malé terčky sloužily pro stanovení anatomických parametrů listu, které mohou ovlivňovat transport CO<sub>2</sub> listem a po vysušení pro analýzu obsahu <sup>13</sup>C v celkové suché hmotě listu.

Z dalšího plně vzrostlého listu z každé varianty jsem vysekla 18 terčků o průměru 2 cm určené pro měření propustnosti kutikul.

### 3. 2 Gazometrické měření

Anatomická struktura listu ovlivňuje základní fyziologii každého listu. Pro určení hodnot fotosyntetických parametrů se běžně používá otevřený gazometrický systém, v tomto případě jsem měřila pomocí přístroje Li-6400 a Li-6400 XT (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Pro každý list byla naměřena tzv.  $A/C_i$  křivka, která zobrazuje závislost rychlosti asimilace CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na koncentraci CO<sub>2</sub> v podprůduchové dutině ( $C_i$ ), a také světelná křivka, zobrazující závislost rychlosti asimilace CO<sub>2</sub> na hustotě dopadajících fotonů fotosynteticky aktivní radiace (PPFD,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Světelná křivka byla měřena při koncentraci CO<sub>2</sub> v okolí listu 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  a rozsahu PPFD 0-1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .  $A/C_i$  křivka byla měřena při rozsahu koncentrací CO<sub>2</sub> 0-1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  při stálé ozáření 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  u varianty G a

$300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  u varianty T (v obou případech šlo o saturační ozáření). Průběhy křivek pro jednotlivé listy jsou zobrazeny v příloze (obr. P1 a P2).

### 3. 3 Anatomické vlastnosti listů

Anatomické vlastnosti mezofylu a epidermis mohou ovlivňovat prostupnost listu pro  $\text{CO}_2$ . Funkční vlastnosti (manifestované toky  $\text{CO}_2$  a vody) pak spoluvytvářejí gradient  $\text{CO}_2$  napříč listem. Proto jsem stanovovala parametry popsané v následujícím oddíle.

#### Měření tloušťky listu ( $d$ , mm)

Tloušťka listů byla měřena pomocí manuálního mikrometru na středu každého z pěti terčků u skrínigové studie, u *F. elastica* na středu osmi menších terčků vyražených z každého listu.

#### Množství listové sušiny na jednotku plochy ( $LMA$ ; leaf dry mass per area, $\text{mg cm}^{-2}$ )

$LMA$  jsem počítala ze vzorce:  $LMA = M_d / A$ , kde  $A$  je plocha listového disku ( $\text{cm}^2$ ) a  $M_d$  je hmotnost listové sušiny (mg) (sušení terčků v sušárně 24 hod při  $80^\circ\text{C}$ ; po 24 hodinách se už hmotnost terčků neměnila).

#### Měření tloušťky kutikuly ( $d_c$ , $\mu\text{m}$ )

Tloušťka kutikuly byla měřena na polotekných řezech listů *F. elastica*, pro obě varianty jsem z druhého a pátého plně vyvinutého listu ostrým skalpelem vyřízla obdélníčky o rozměrech ca  $3\times 15\text{mm}$ , které jsem okamžitě dala do fixačního roztoku, glutaraldehydu (GA). Po minimálně 12 hodinách jsem GA odstranila vypíracím roztokem (4 % roztok glukózy v 0,1 M roztoku fosfátového pufru) a vzorek znovu fixovala 4% roztokem oxidu osmičelého ( $\text{OsO}_4$ ). Přes acetonovou řadu jsem vzorky odvodnila a zalila do epoxidové pryskyřice Spurr. Po vytvrzení bločků jsem krájela na ultramikrotomu (Leica ultracut UCT, Německo) polotekné řezy o tloušťce 400 nm. Polotekné řezy jsem přenesla na podložní sklíčko, kde jsem jim dodala kontrast pomocí genciánové modře (2 minuty, teplota  $60\text{-}70^\circ\text{C}$ ). V programu ImageJ jsem následně pro každý list měřila  $d_c$  z pěti řezů.

#### Výpočet průduchové hustoty ( $SD$ ) a průduchového indexu ( $SI$ )

Gradient koncentrace  $\text{CO}_2$  napříč listem je kromě rychlosti fotosyntetické asimilace ovlivněn také průduchovou vodivostí pro  $\text{CO}_2$ , a tedy otevřeností a četností průduchových pórů. Izolované kutikuly byly proto použity také pro zjištění průduchové (stomatální) hustoty ( $SD$ ) a průduchového (stomatálního) indexu ( $SI$ ). Části kutikuly ze dvou výseků středové části listů *F.*

*elastica* omyté destilovanou vodou jsem přenesla na podložní sklíčko a přikryla sklíčkem krycím. Z každého vzorku jsem pod optickým mikroskopem (Olympus BX61, Japan) nasnímal 10 polí o velikosti cca 3,4 mm<sup>2</sup> při zvětšení 100 krát, v těchto polích jsem následně průduchy počítala pomocí softwaru ImageJ a jejich počet jsem přepočítala na 1 mm<sup>2</sup>, čímž jsem určila průduchovou hustotu (*SD*).

Dalších 5 polí velikosti cca 0,13 mm<sup>2</sup> jsem nasnímal z každého vzorku při zvětšení 500 krát, na těchto snímcích jsem počítala nejen počet průduchů, ale také počet dlaždicovitých buněk. Z tohoto jsem následně mohla spočítat *SI* ze vztahu  $SI = SC / (SC + PC) \times 100$ , kde *SC* je počet průduchových buněk a *PC* je počet dlaždicovitých buněk (*Pavement cell*). Výslednou hodnotu jsem pro lepší přehlednost uváděla v procentech.

### **3. 4 Vizualizace povrchu listu *F. elastica* pomocí skenovacího elektronového mikroskopu**

Ze střední části plně vyvinutého listu *F. elastica* varianty G i T jsem ostrým skalpelem vyřízla obdélníček o rozměrech ca 0,5x1 cm, u kterého jsem pomocí skenovacího elektronového mikroskopu vizualizovala jeho povrchovou strukturu. Po odběru jsem vzorky ihned dala do fixačního roztoku, glutaraldehydu (GA). Po minimálně 12 hodinách jsem GA odstranila vypírácím roztokem (4 % roztok glukózy v 0,1 M roztoku fosfátového pufru) a vzorek znovu fixovala 4% roztokem oxidu osmičelého (OsO<sub>4</sub>). Přes acetonovou řadu jsem vzorky odvodnila a vysušila metodou kritického bodu. Kousky listu jsem nalepila na kovový nosič abaxiální stranou nahoru a nechala vzorek pozlatit. Samotné prohlížení vzorků probíhalo na elektronovém mikroskopu Jeol 7401F (The JSM-7400F Scanning Electron Microscope, USA).

### **3. 5 Izolace kutikul**

Gradient CO<sub>2</sub> napříč listem jsem stanovovala na základě izotopového složení kutikul izolovaných z opačných stran listu. V rámci skrínigové studie jsem pro každý rostlinný druh izolovala kutikuly z 20 terčíků o průměru 14 mm. U rostliny *F. elastica* to byly pro variantu G i T terčíky o průměru 4 cm (učené pro analýzu kutikulárních vosků a izotopového složení) a průměru 2 cm (pro měření propustnosti kutikuly). Všechny terčíky jsem označila na abaxiální straně lihovým popisovačem a vložila je do 2 % roztoku celulózy a pektinázy v citrátovém pufru (pH = 3) s přídatkem azidu sodného (NaN<sub>3</sub>) jako konzervantu. Po dokončení izolace jsem jednotlivé kutikuly opláchla v destilované vodě, usušila na teflonových výsecích a uložila do mikroskopavek (zvláště ad- a abaxiální strana) nebo do papírového sáčku.

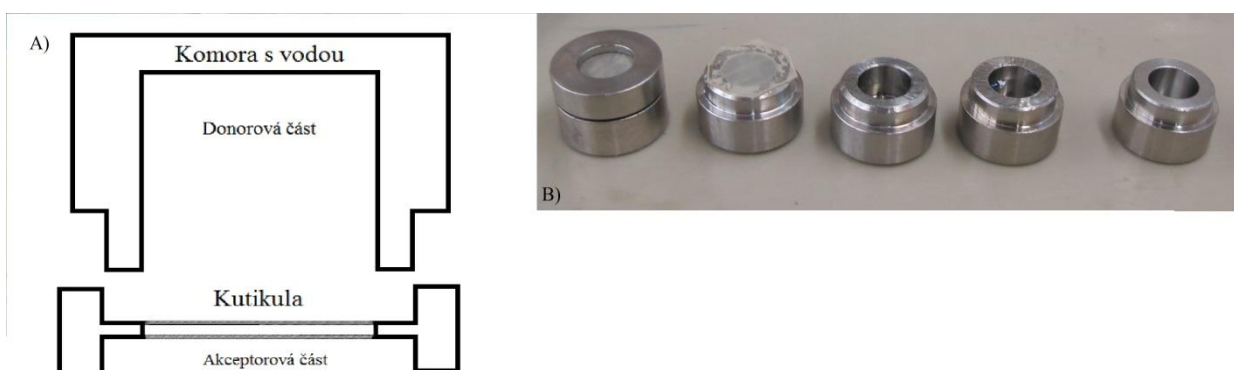


### 3. 6 Měření propustnosti kutikuly izolované z listu *F. elastica* pomocí vážkové analýzy

Kutikula je účinnou, ale ne dokonalou bariérou pro prostup vody a CO<sub>2</sub>. Pro gravimetrická měření propustnosti pro vodu jsem použila kutikuly izolované z 18 terčičků o průměru 2 cm vyražených z listů *F. elastica*. Měření probíhalo pouze na adaxiálních (bezprůduchových) kutikulách v ocelových měřicích komůrkách (Schreiber and Schönherr 2009). Komůrka se skládala ze dvou na sebe dosedajících částí, které jsem utěsnila silikonovou vakuovou vazelínou (viz obr. 6). Do spodní (donorové) části jsem dala 800 μl vody, nad její hladinu jsem upevnila měřenou kutikulu tak, aby její fyziologicky vnitřní strana směřovala k hladině vody. Po zajištění kutikuly jsem přiklopila horní část komůrky s centrálním otvorem a celou komůrku otočila dnem vzhůru. Komory s upevněnými kutikulami jsem umístila do uzavíratelné umělohmotné misky na vysušený silikagel, kterou jsem nadále uchovávala v termostatu při 25°C. V intervalech 24-72 hodin po dobu 11 dní jsem měřila úbytek váhy komůrky, který je přímo úměrný hmotnosti vody prošlé přes kutikulu. Ze sklonu křivek transpirační kinetiky jsem počítala propustnost kutikul  $P$  každé z kutikul podle vzorce (5):

$$P = \frac{F}{A \cdot \Delta c} \quad \text{Rovnice 5}$$

kde  $P$  je propustnost kutikuly ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ), tok  $F$  ( $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$ ) představuje sklon regresní křivky transpirační kinetiky,  $A$  ( $\text{m}^2$ ) udává plochu měřeného terčičku, která byla  $1,13 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ , a  $\Delta c$  ( $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ ) představuje gradient koncentrace vodní páry přes kutikulu.



**Obr. 6:** Komora používaná pro gravimetrické měření propustnosti neprůduchových kutikul; A – schematický náčrtek, v donorové části je destilovaná voda, kutikula je umístěna fyziologicky vnitřní stranou k donorové části; B – fotografie používaných komor

### 3. 7 Extrakce kutikulárních vosků

Pro zjišťování gradientu CO<sub>2</sub> napříč listem jsem vycházela jak z izotopového složení kutikulární membrány, tak z obsahu <sup>13</sup>C v kutikulárních voscích. Proto bylo nutné nejprve vosky extrahovat. Vzhledem k chemické povaze vosků je potřeba provádět extrakci ve středně polárním médiu, čímž dosáhneme uvolnění jak extrémně hydrofobních uhlovodíků tak i polárnějších sloučenin (Riederer and Schneider, 1989). Za tímto účelem byla použita izolace pomocí chloroformu (Holloway 1984); usušené izolované kutikuly byly přemístěny do skleněných scintilačních lahvíček, zality chloroformem, uzavřeny víčky s teflonovým nebo hliníkovým septem a minimálně 12 hodin otáčeny a promíchávány na přístroji Tube Roller.

### 3. 8 Kvantitativní a kvalitativní analýza složení kutikulárních vosků rostliny *F. elastica*

Analyzovala jsem kutikulární vosky listů *F. elastica*, ze dvou jedinců pěstovaných v odlišných podmínkách (viz rostlinný materiál). Kutikulární vosky jsem nechala rozpustit v chloroformu a přidala jsem k nim 10 µl vnitřního standardu (Tetrakosan, alkan C<sub>24</sub>). Následující den jsem chloroform odpařila na ca 0,5 ml a následně jsem přítomné uhlovodíky derivatizovala přidáním 20 µl BSTFA (A,A – bistrimetylsilyltrifluoroacetamid) za přítomnosti 20 µl pyridinu při teplotě 70°C po dobu 45 minut. Pomocí BSTFA byly převedeny volné hydroxylové a karboxylové skupiny na odpovídající trimetylsilyl deriváty. Kvantitativní analýzu jsem provedla nastříknutím 1 µl vzorku na kolonu plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID; Agilent 6890N Network Gas Chromatograph, Agilent Technologies, USA). Kvalitativní analýzu jsem provedla nastříknutím 1 µl vzorku na kolonu plynového chromatografu s hmotnostně spektrometrickým detektorem (GC-MS; Agilent 5973Network Mass Selective Detector, USA). Z výsledků GC-MS jsem přiřadila jednotlivým píkům chromatogramu jejich chemické složení. Plochy píků jsem přepočítala pomocí vnitřního standardu na množství jednotlivých složek kutikulárních vosků.

### 3. 9 Analýza obsahu stabilních izotopů uhlíku

Analýza zastoupení stabilního izotopu uhlíku <sup>13</sup>C byla prováděna u tří typů vzorků: **i)** listové terčíky, vysušené v laboratorní sušárně při teplotě 80°C během 24 hodin, jsem zvažila a pomocí kulového mlýnku (Retsch MM200, Haan, Německo) namlela na jemný prášek. Vzorky o hmotnosti 0,200-0,300 mg jsem zabalila do cínových kapslí a tím je připravila pro vlastní analýzu. **ii)** izolované kutikuly jsem pomocí skalpelu nakrájela na malé kousky, z nichž jsem

odebírala navážku v objemu 0,160-0,220 mg. Tu jsem opět zabalila do cínových kapslí. **iii)** vosky rozpuštěné v chloroformu jsem postupně přenášela do cínových kapslí a následně jsem nechala chloroform odpařit. Tak jsem postupně získala navážku vzorku 0,120-0,180 mg.

Vlastní analýza byla prováděna na izotopovém poměrovém hmotnostním spektrometru IRMS (Delta plus XL, ThermoFinnigan, Brehmen, DE) spojeném s prvkovým analyzátozem (Vario MicroCube, Elementar Analysen systeme, DE). Vzorky byly spalovány na CO<sub>2</sub> při teplotě 950°C, obsah izotopů uhlíku byl vyjádřen pomocí poměru <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C (R) ve vzorku, hodnota diskriminace δ (v ‰) byla vypočítaná jako relativní rozdíl mezi R vzorku a R standardu VPDB (Vienna PeeDee Belemnite):  $\delta = (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 1000$ .

### 3. 10 Výpočet vnitřní listové koncentrace CO<sub>2</sub>

Pro stanovení vnitřní listové koncentrace ( $C_i$ ) integrované přes celou dobu růstu listu jsem použila δ listové sušiny. Diskriminaci <sup>13</sup>C během fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub>, Δ, lze vyjádřit upraveným vztahem 4 (Farquhar et al., 1989):

$$\Delta = a + (b - a) \cdot \frac{C_i}{C_a} \quad \text{Rovnice 6}$$

Kde  $a$  a  $b$  jsou konstanty ( $a = 4,4\text{‰}$  a  $b = 27\text{‰}$ , viz Stabilní izotopy uhlíku <sup>12</sup>C a <sup>13</sup>C, kde  $a$  a  $b$  jsou označovány jako  $\varepsilon_a$  a  $\varepsilon_b$ ),  $C_a$  je koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře kolem rostliny ( $C_a$  bylo naměřeno pro obě varianty 410 ‰) a  $C_i$  je vnitřní listová koncentrace CO<sub>2</sub> vážená rychlostí fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub> během dne a akumulovaná za dobu akumulace biomasy listu. Δ je odvozena od množství <sup>13</sup>C v rostlinné tkáni, δ<sub>L</sub>, a ve vzduchu, δ<sub>a</sub>;  $\Delta = (\delta_a - \delta_L) / [(\delta_L/1000) + 1]$  (viz také rovnice 3), Δ i δ jsou zde vyjádřeny v promilích (‰). Protože výraz  $(\delta_L/1000) + 1$  je roven téměř 1, můžeme zjednodušit  $\Delta \approx (\delta_a - \delta_L)$ . Tím vznikne rovnice pro výpočet  $C_i$ :

$$C_i = C_a \cdot \frac{\delta_a - \delta_L - a}{b - a} \quad \text{Rovnice 7}$$

Je třeba si uvědomit, že takto stanovená  $C_i$  je střední koncentrací přes celý intercelulární prostor integrovanou v čase.

### 3. 11 Výpočet poklesu koncentrace CO<sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou hypostomatického listu

CO<sub>2</sub> je během difuze napříč listem fixováno ve fotosyntéze. Proto se po dráze („on-line“) postupně snižuje jeho koncentrace ( $C_i$ ). Diskriminace v chloroplastech Δ (tj. izotopové složení

asimilátů  $\delta_L$  vzhledem k  $\text{CO}_2$  v jejich mezibuněčném okolí  $\delta_a$ ) je závislá na koncentraci  $C_i$  (viz Rovnice 6), ale také na hodnotě  $\delta_a$  [ $\delta \approx (\delta_a - \delta_L)$ ]. Protože  $C_i$  je nejvyšší u vstupu do listu (u průduchu na abaxiální straně,  $C_b$ ) a klesá směrem k bezprůduchové adaxiální straně k hodnotě  $C_a$ , měly by být asimiláty tvořené a ukládané na průduchové straně více diskriminované (ochuzenější o  $^{13}\text{C}$ ) než na opačné straně pokud by se  $\delta_a$  na dráze  $\text{CO}_2$  listem nezměnilo. Průduchová kutikula by proto měla být chudší na  $^{13}\text{C}$  než neprůduchová úměrně rozdílu  $C_b - C_a$ . Izotopové složení  $\text{CO}_2$  v atmosféře napříč listem,  $\delta_a$ , se ale se mění ze dvou důvodů: 1/ větší diskriminace při karboxylaci na průduchové straně obohacuje okolní atmosféru o  $^{13}\text{CO}_2$  více než u neprůduchové strany 2/  $^{13}\text{CO}_2$  difunduje pomaleji napříč listem než  $^{12}\text{CO}_2$ . Oba tyto procesy, 1/ i 2/, vytvářejí relativní přebytek  $^{13}\text{CO}_2$  na průduchové straně uvnitř listu ve srovnání s neprůduchovou stranou a zvyšují tak pravděpodobnost  $^{13}\text{CO}_2$  asimilace v okolí průduchů. Jdou tak proti zmíněné tendenci ochuzení průduchové kutikuly o  $^{13}\text{C}$  proti neprůduchové kutikule jako indikátoru rozdílu koncentrace  $\text{CO}_2$  napříč listem. Matematické zpracování výše uvedených procesů vedlo k vyjádření vztahu mezi izotopovou rozdílností kutikul nebo jiných deposit z opačných stran listu a gradientem koncentrace  $\text{CO}_2$  napříč listem (Šantrůček *et al.* nepublikováno):

$$\frac{c_d}{c_b} = 1 - \frac{1}{1 + \frac{\delta_L - \delta_b + a}{\delta_{AB} - \delta_{AD}}} \quad \text{Rovnice 8}$$

Podle rovnice 8 můžeme počítat poměr koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi adaxiální (bezprůduchovou) a abaxiální (průduchovou) stranou listu,  $C_d/C_b$ . Ze vzorce vyplývá, že poměr  $C_d/C_b$  klesá od jedničky k nule se zvětšujícím se rozdílem v izotopovém složení abaxiální a adaxiální strany listu,  $|\delta_{AB} - \delta_{AD}|$ , a je úměrný ochuzení listové tkáně v obsahu  $^{13}\text{C}$  oproti okolní atmosféře.  $\delta_L$  je hodnota  $\delta$  měřená z listové sušiny,  $\delta_b$  označuje obsah  $^{13}\text{C}$  v podprůduchové dutině ( $-9,1 \text{‰}^2$ ),  $a$  je izotopový frakcionační faktor pro difuzi  $\text{CO}_2$  ve vzduchu ( $4,4 \text{‰}$ ),  $\delta_{AB}$  a  $\delta_{AD}$  vyjadřuje izotopové složení kutikuly nebo kutikulárních vosků z abaxiální a adaxiální strany listu.

Pro použití tohoto vzorce musíme přijmout tyto předpoklady: Zaprvé předpokládáme, že kutikuly a kutikulární vosky jsou syntetizovány z asimilátů vytvořených v chloroplastech lokalizovaných v blízkosti dané kutikuly. Zadruhé předpokládáme, že post-fotosyntetická

<sup>2</sup> Vnější atmosféra je ochuzena v obsahu  $^{13}\text{C}$  o  $8 \text{‰}$  ( $C_a$ ), difuzí skrz průduchy se obsah těžšího uhlíku snižuje o další  $1,1 \text{‰}$ , takže  $\delta_b$  ( $^{13}\text{C}$  v podprůduchové dutině) předpokládáme  $-9,1 \text{‰}$ .

diskriminace během syntézy prekurzorů kutikuly a kutikulárních vosků je nezávislá na straně listu. Zatřetí pro zjednodušení výpočtu předpokládáme, že obsah  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) a koncentrace  $\text{CO}_2$  ( $c$ ) vzduchu uvnitř listu odpovídá  $\delta$  a  $c$  vzduchu obklopujícího buňky palisádového parenchymu na bezprůduchové straně listu ( $\delta_d, c_d$ ), ale liší se od průduchové strany listu ( $\delta_b, c_b$ ).

### **3. 14 Statistické vyhodnocení**

Data jsem analyzovala v programu Portable Statistica 8. Jednocestnou ANOVu jsem použila pro porovnání jedné varianty (G nebo T) v závislosti na stáří listu, pro post-hoc porovnání jsem použila Tukeyho HSD test. Pro porovnání variant mezi sebou jsem používala párový t-test. U všech výsledků je uveden průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Jako statisticky významný rozdíl jsou uváděny pravděpodobnosti  $p < 0,05$ .

## 4. Výsledky

### 4. 1 Anatomické vlastnosti listů *F. elastica*

Anatomické vlastnosti listu mohou ovlivňovat prostupnost listu pro CO<sub>2</sub> a tak se podílet na vytváření gradientu CO<sub>2</sub> napříč listem. Pěstováním rostlin v podmínkách s odlišnou intenzitou ozáření a teplotou jsem chtěla docílit změny v anatomických vlastnostech listů *F. elastica*.

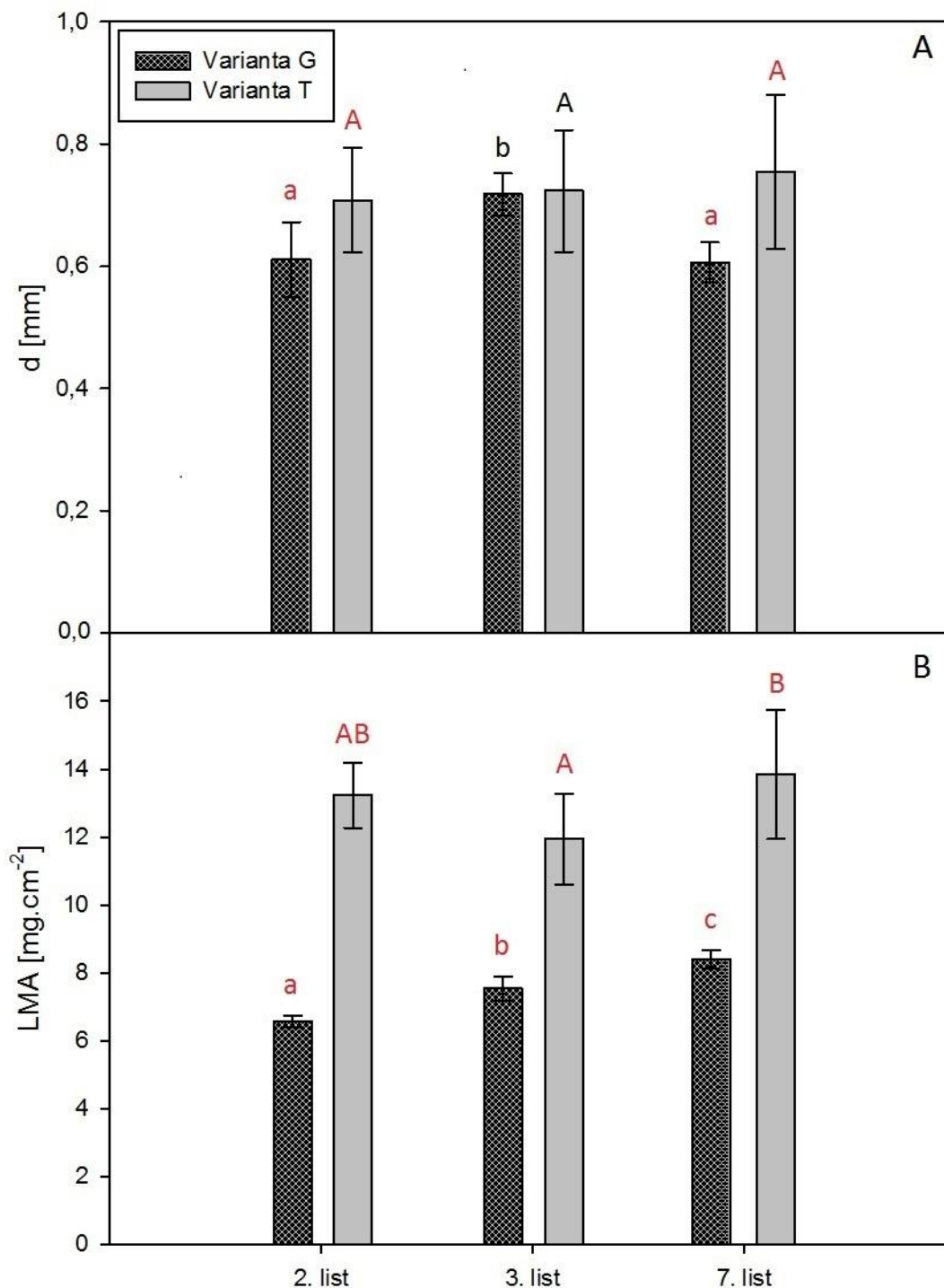
**Tloušťka listu ( $d$ ;mm)** byla u varianty T (rostlina rostoucí při vyšší teplotě a ozáření) v průměru o 14 % větší než u varianty G (rostlina rostoucí při nižší teplotě a ozáření). Statisticky významný ( $p < 0,05$ ) byl tento rozdíl pouze u 2. a 7. vzrostlého listu (viz obr. 7). Průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v příloze v tabulce P2.

**Hmotnost sušiny na jednotku plochy listu ( $LMA$ ,  $mg \cdot cm^{-2}$ )** je funkční vlastností dobře reflektující environmentální podmínky, za kterých rostlina rostla. Silně koreluje s celkovým množstvím fotonů dopadajících během celého dne (DPI) (Niinemets et al., 2004) a také s fotosyntetickou kapacitou listu (Ellsworth and Reich, 1993; Niinemets and Tenhunen, 1997).

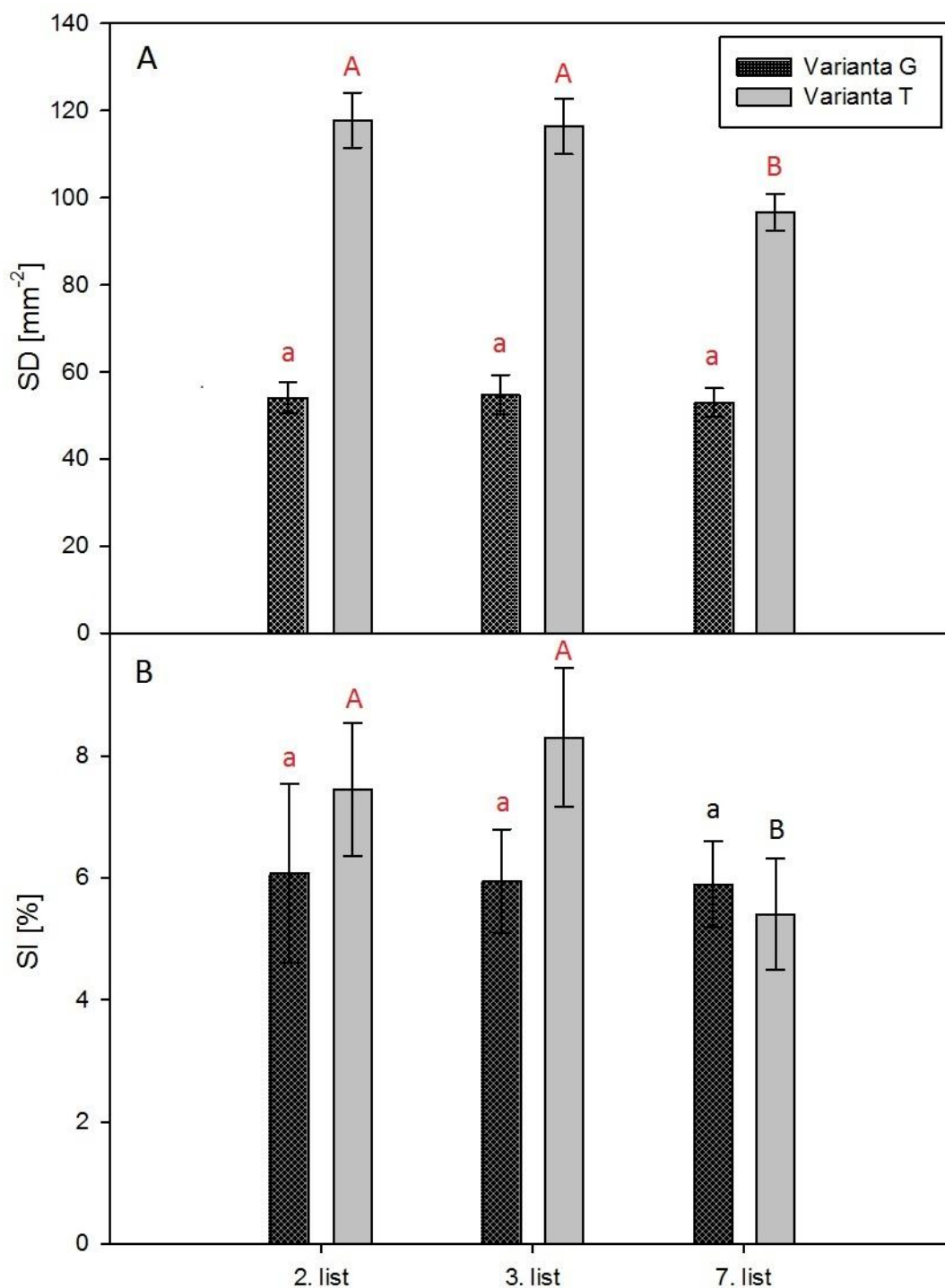
U varianty T byla  $LMA$  1,6 až 2 krát větší než u varianty G (tedy statisticky významně větší,  $p < 0,05$ ). U varianty G se navíc se stářím listu zvyšovalo, u varianty T nikoliv (viz obr. 7). Vypočítané průměry jsou opět uvedeny v příloze v tabulce P2.

**Hustota průduchů ( $SD$ ) a průduchový index ( $SI$ )** jsou vlastnosti podílející se na určení rychlosti toků plynů do a z listu, pro nás je významný zejména tok CO<sub>2</sub> a vodní páry.

Množství průduchů na jednom mm<sup>2</sup> bylo u varianty T 1,8 až 2,2 krát větší než u varianty G, tento rozdíl byl u všech listů statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Listy odlišného stáří měly u varianty G shodnou  $SD$ , u varianty T se lišil pouze 7. list (viz obr. 8). Průduchový index se u varianty G se stářím listu neměnil, u varianty T se lišil u 7. listu, kdy byl nižší. Mezi variantou G a T byl statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) u 2. a 3. listu (viz obr. 8). Průměrné hodnoty  $SD$  a  $SI$  se směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v příloze v tabulce P2.



**Obr. 7:** Tloušťka listu  $d$  [mm] (A) a množství listové sušiny na jednotku plochy,  $LMA$  [ $mg \cdot cm^{-2}$ ] (B) u varianty G (šrafované sloupečky) a varianty T (šedé sloupečky). Měřeno bylo pro každou skupinu 8 listových terčů o průměru 12 mm, z jejichž sušiny je vypočteno  $LMA$ . Malými písmeny je znázorněno statistické hodnocení rozdílů ( $p < 0,05$ ) u listů z varianty G, velkými písmeny u varianty T. Červené písmo označuje statisticky významný ( $p < 0,05$ ) rozdíl mezi variantou G a T pro daný list ( $n=8$ ). Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.

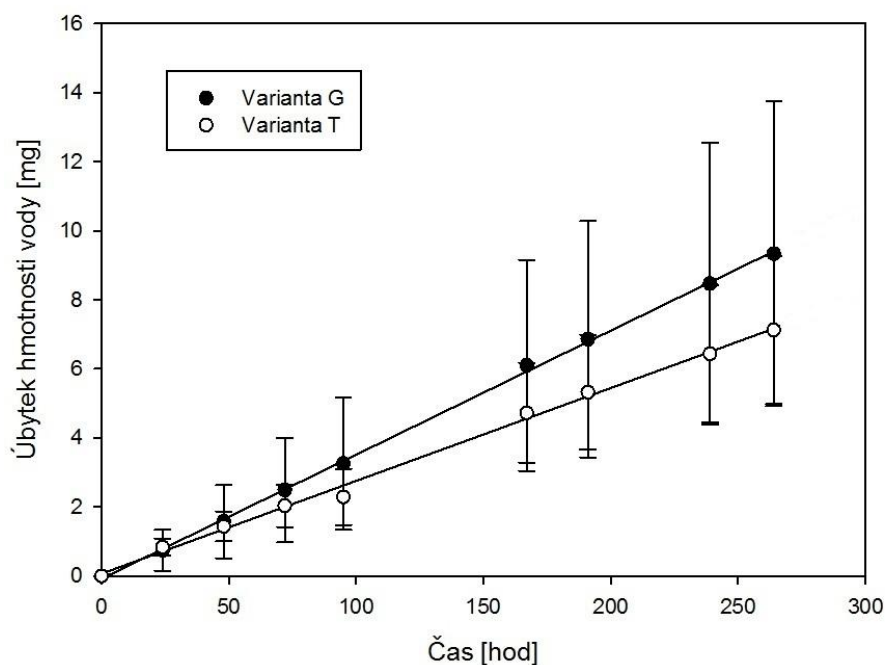


**Obr. 8:** Množství průduchů na mm<sup>2</sup> listu u varianty G (šrafované sloupečky) a varianty T (šedé sloupečky). Z každého listu bylo *SD* počítáno z výšek č. 6 a 7 (variabilita v počtu terčíků byla mezi jednotlivými terčíky malá), z každého terčíku jsem snímala 10 ploch. V grafu jsou zobrazeny průměrné hodnoty. Malými písmeny je znázorněno statistické hodnocení rozdílů ( $p < 0,05$ ) u listů z varianty G, velkými písmeny u varianty T. Červené písmo označuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi variantou G a T pro daný list. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.

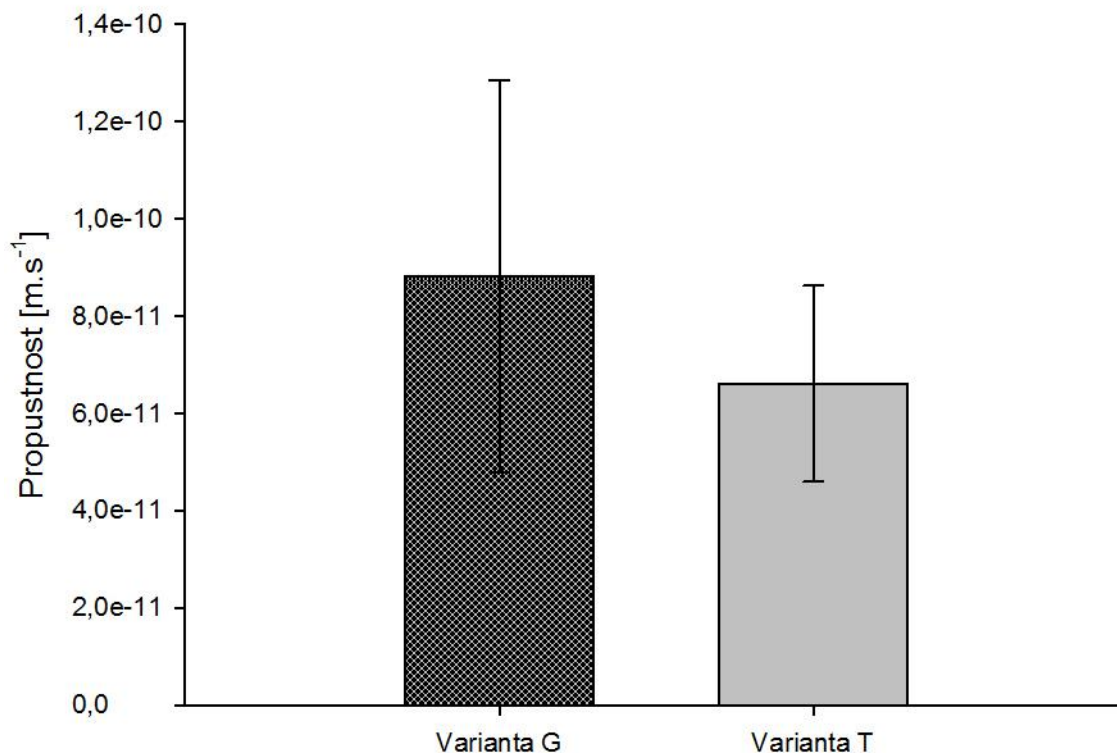


#### 4. 2 Propustnost izolované kutikuly *F. elastica* měřená pomocí vážkové analýzy

Kutikula tvoří účinnou, ale ne zcela dokonalou bariéru pro prostup vody a CO<sub>2</sub>. Pro měření propustnosti kutikuly pro vodu (*P*) jsem použila izolované kutikuly z 18 terčíků, 9 od každé varianty (tedy G a T). Měřila jsem ztrátu vody v čase z komor umístěných na silikagelu. Z naměřených hodnot jsem vytvořila graf závislosti úbytku vody v donorové části komory na čase (viz obr. 9). Ze sklonu těchto „transpiračních“ křivek jsem vypočítala propustnost dané kutikuly pro vodu. Propustnost pro vodu byla u kutikuly varianty G v průměru 1,3 krát větší než u kutikuly varianty T (viz obr. 10), nicméně vzhledem k velkým směrodatným odchylkám nebyl tento rozdíl statisticky významný ( $p > 0,05$ ).



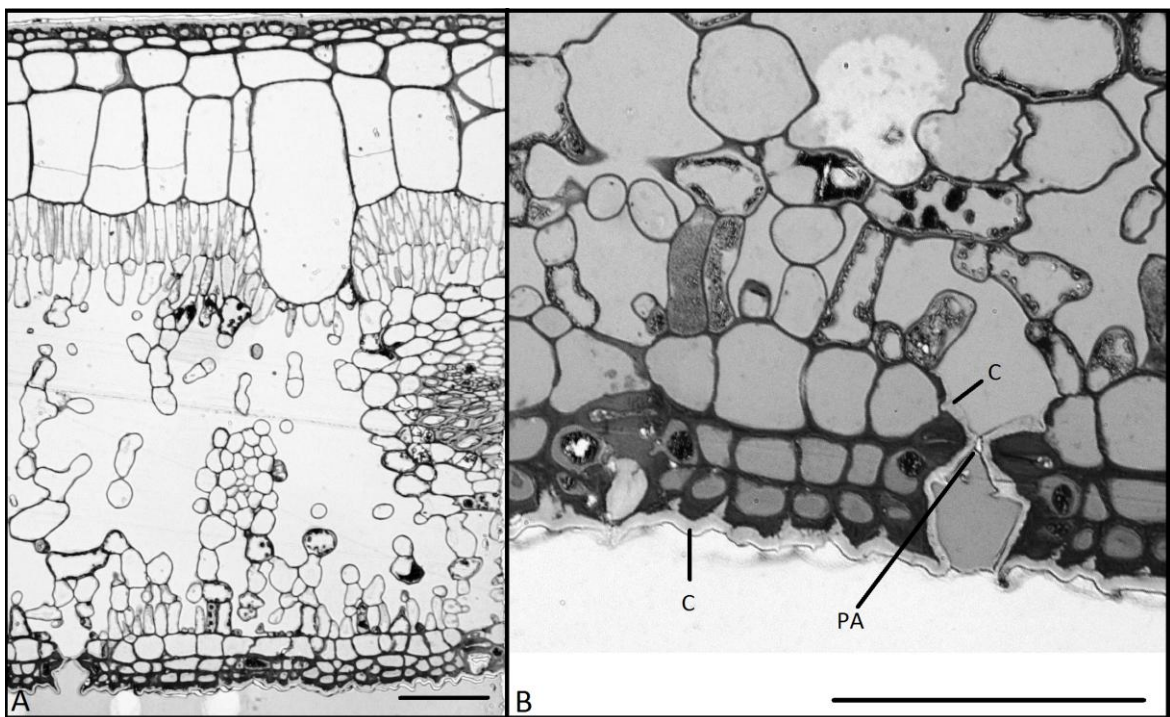
**Obr. 9:** Tok vody přes svrchní kutikulu měřený po dobu 264 hodin při 25°C a 0% vlhkosti vzduchu nad kutikulou (n=9). Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.



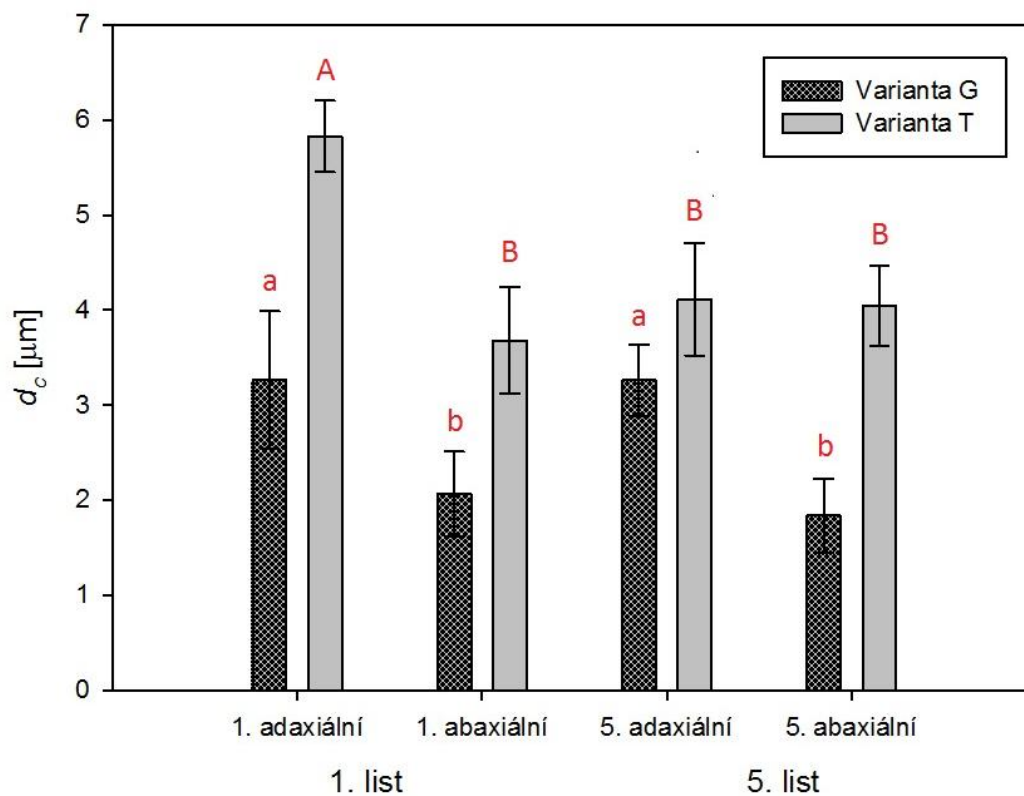
**Obr. 10:** Propustnost kutikuly u rostlin rostoucích za odlišné teploty a ozáření. Kutikula varianty G byla v průměru 1,3 krát propustnější než kutikula varianty T. Nicméně vzhledem k velkým směrodatným odchýlkám (zobrazeným v podobě chybových úseček) není tento rozdíl statisticky významný (n=9).

#### 4. 3 Tloušťka kutikuly, $d_c$ [ $\mu\text{m}$ ]

Také jsem se zajímala, jestli propustnost kutikuly a její tloušťka,  $d_c$ , jsou ve vzájemném vztahu. Tloušťku jsem měřila z polotěných řezů (viz obr. 11) listů rostliny *F. elastica*, u 1. a 5. plně vzrostlého listu varianty G a T.  $d_c$  byla u varianty T 0,3 až 2,2 krát větší, ve všech případech byl rozdíl statisticky významný ( $p < 0,05$ ).  $d_c$  byla také větší na adaxiální straně listu oproti abaxiální, u 5. listu varianty T byl tento rozdíl pouze malý, v dalších případech byl statisticky významný ( $p < 0,05$ , viz obr. 12). Průměrné hodnoty  $d_c$  pro jednotlivé listy jsou uvedeny v příloze (tabulka P2).



**Obr. 11:** Ukázka polotného řezu (400  $\mu\text{m}$ ) listem rostliny *F. elastica*. A - řez napříč celým listem, B - detailní záběr abaxiální strany listu; PA - průřez průduchovým aparátem, C - kutikula lemující celou průduchovou štěrbinu i část podprůduchové štěrbinu; úsečka zobrazuje 100  $\mu\text{m}$ .

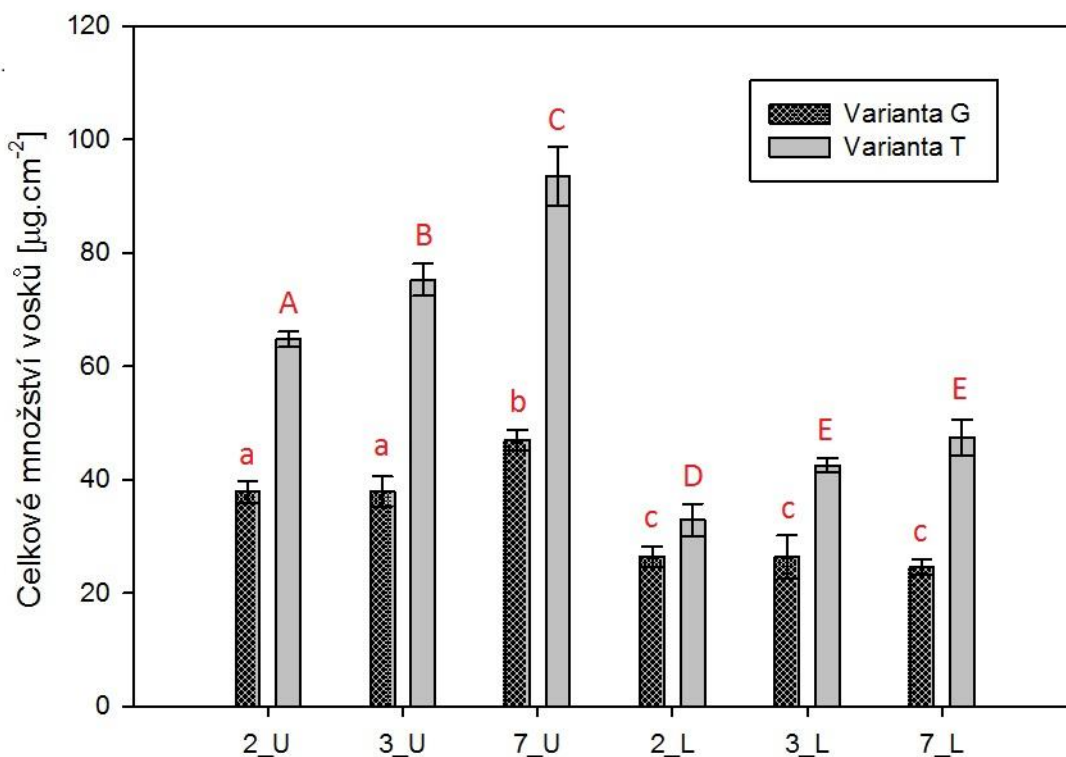


**Obr. 12:** Popisek na následující straně

**Obr. 12:** Tloušťka kutikuly,  $d_c$  [ $\mu\text{m}$ ], u rostliny *F. elastica*, varianty G (šrafované sloupečky) a varianty T (šedé sloupečky). Zvlášť byla měřena adaxiální (horní) a abaxiální (spodní) strana listu. Malými písmeny je znázorněno statistické hodnocení rozdílů ( $p < 0,05$ ) u listů z varianty G, velkými písmeny u varianty T. Červené písmo označuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi variantou G a T pro daný list. Zobrazen je průměr měřený u 5 polotenzkých řezů, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.

#### 4. 5 Kvantitativní a kvalitativní analýza složení kutikulárních vosků u *F. elastica*

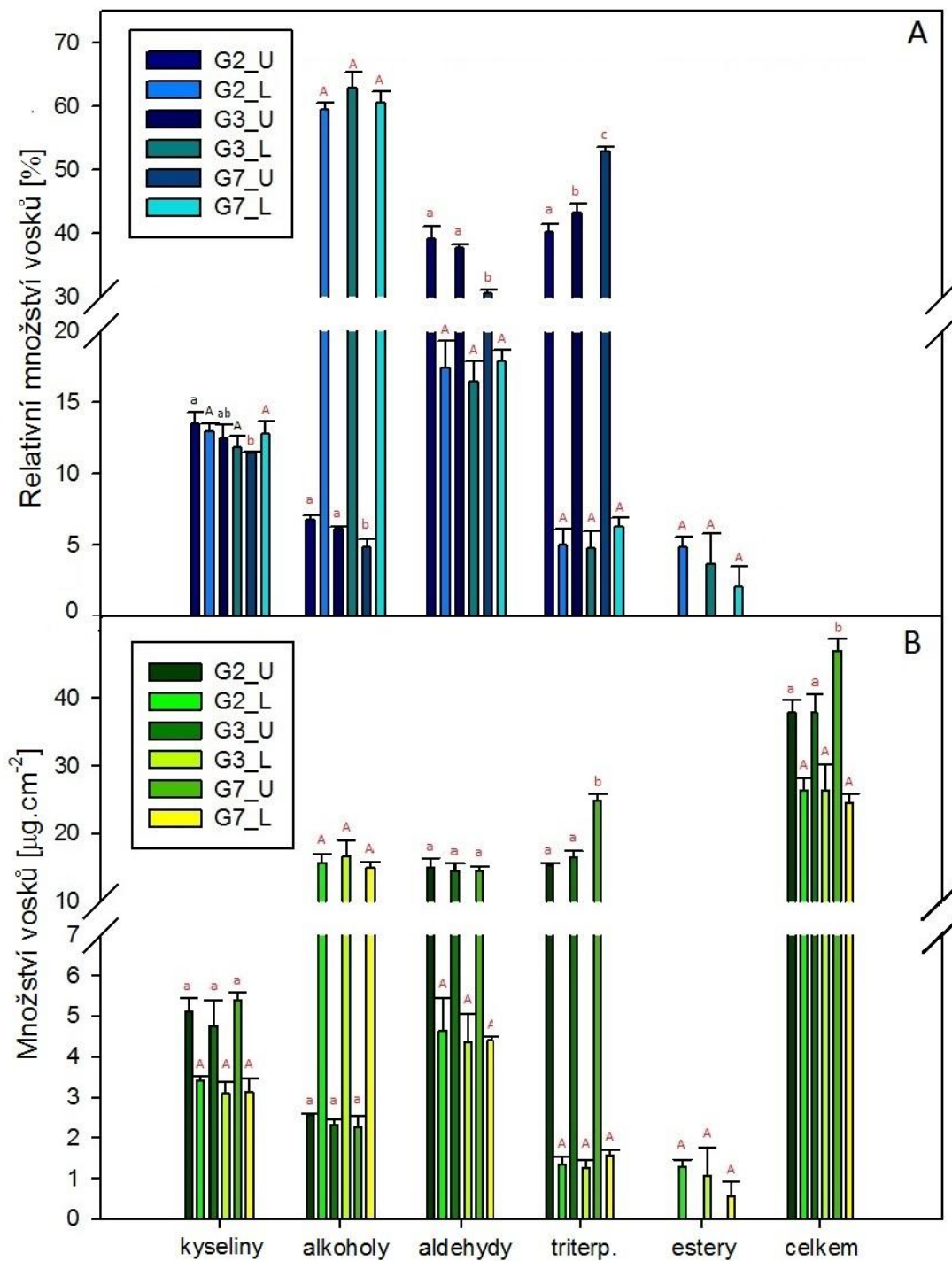
Vlastnosti kutikuly (například propustnost, schopnost odpuzovat vodu aj.) jsou ovlivněny kvantitou a složením směsi kutikulárních vosků. Proto jsem analyzovala kvalitativní (GC-MS) a kvantitativní (GS-FID) složení kutikulárních vosků extrahovaných z listů různého stáří (2., 3. a 7. vzrostlý list) rostlin *F. elastica* pěstovaných za odlišné teploty a ozáření (varianta G a T). **Celkově** bylo u varianty T extrahováno 1,2 až 2,0 krát více vosků než u varianty G, ve všech případech byl tento rozdíl statisticky významný ( $p < 0,05$ ). U varianty T se navíc množství vosků zvyšovalo se stářím listu (viz obr. 13). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky pro jednotlivé listy jsou uvedeny v příloze v tabulce P3.



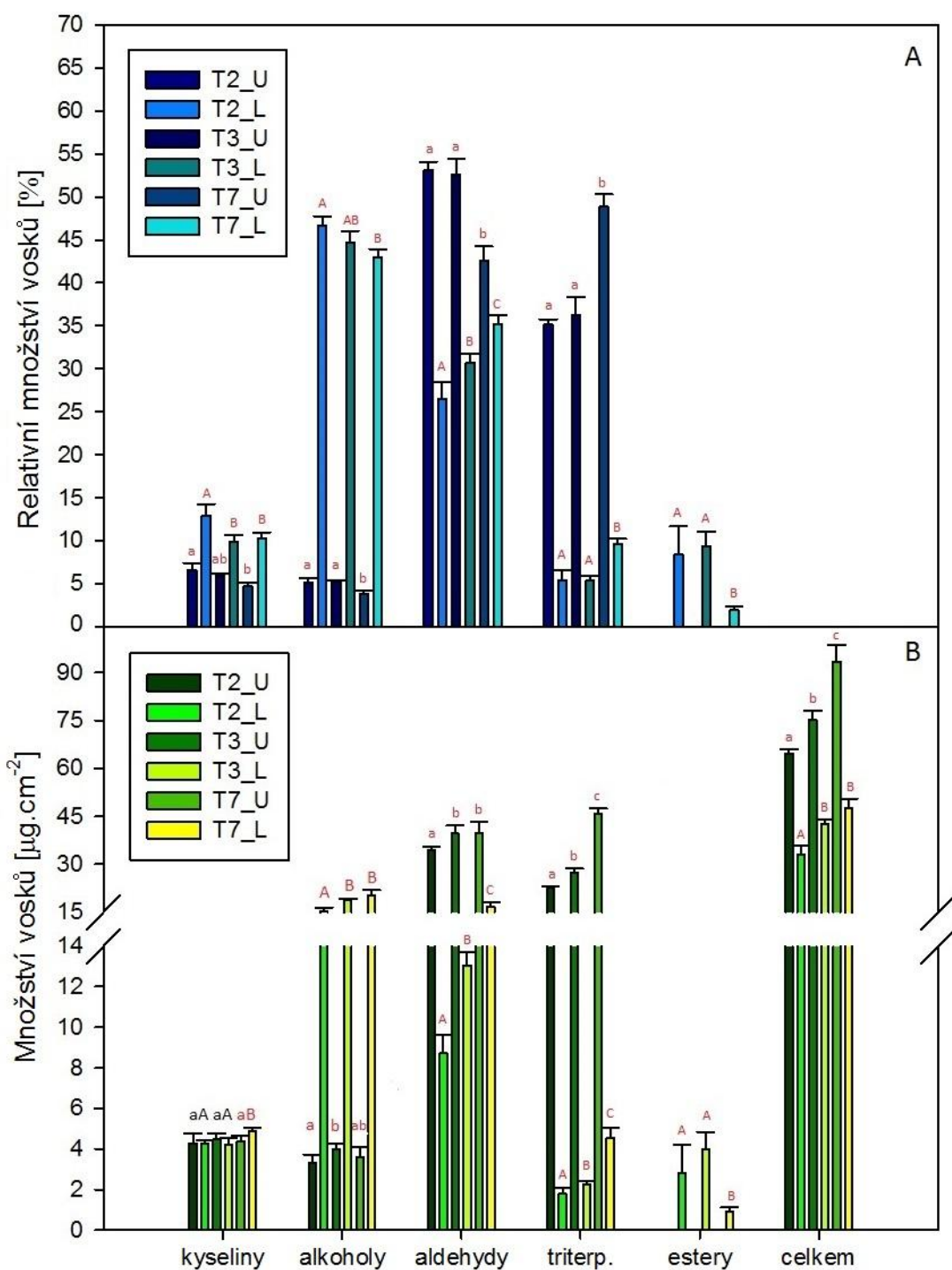
**Obr. 13:** Celkové množství izolovaných kutikulárních vosků pro variantu G (šrafované sloupečky) a variantu T (šedé sloupečky). Vosky byly izolovány v rámci jedné varianty ze 3 listů odlišného stáří (2., 3., a 7. plně vzrostlý list), zvlášť z horní (U) a spodní (L) strany listu. Malými písmeny je znázorněno statistické hodnocení rozdílů v kvantitě vosků u varianty G, velkými písmeny u varianty T. Červené písmo označuje statisticky významný rozdíl mezi variantou G a T pro daný list ( $n=4$ ). Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.

Ze směsi vosků jsem pomocí GC-MS identifikovala u varianty G 21 sloučenin na adaxiální a 22 sloučenin na abaxiální straně, u varianty T to bylo 20 sloučenin na adaxiální a 24 sloučenin na abaxiální straně listu. Celý seznam identifikovaných látek je uveden v tabulce P4 v příloze. Složky kutikulárních vosků jsem zařadila do funkčních skupin (tedy kyseliny, alkoholy, aldehydy, triterpenoidy a estery).

**Spodní strana listu se od horní** lišila u varianty T i G. Skupinu esterů jsem identifikovala pouze ve směsi vosků izolovaných z abaxiální strany listu, další výrazné rozdíly byly u skupiny alkoholů, triterpenoidů a aldehydů. Tyto rozdíly jsou statisticky významné ( $p < 0,05$ ) a to nejen v absolutních číslech, ale i v relativním zastoupení. Množství kyselin bylo u varianty G mezi stranami listu statisticky odlišné v absolutních číslech, avšak při přepočtu na procentuální zastoupení byly hodnoty vyrovnané (viz obr. 14). U varianty T tomu bylo naopak. Se stárnutím listu nebyly pozorovány přílišné změny, u varianty T docházelo k mírnému nárůstu v absolutním množství alkoholů, aldehydů a triterpenoidů (viz obr. 15). **Velké rozdíly jsem pozorovala také mezi danými variantami, tedy mezi variantou T a G.** Jak již bylo uvedeno, u varianty T bylo izolováno 1,2-2x více vosků. Z tohoto důvodu budu mezi sebou porovnávat relativní množství jednotlivých skupin (porovnání absolutních hodnot viz obr. P3 v příloze). U varianty T bylo identifikováno větší množství aldehydů, a to jak na horní, tak na spodní straně listu. Další významné rozdíly byly pozorovány u skupiny kyselin a alkoholů, kde ale byly reakce na vnější podmínky opačné u horní a spodní strany; na adaxiální straně bylo výrazně více kyselin u varianty G, u alkoholů byly tyto rozdíly mnohem menší (statisticky významné jen u 2. a 7. listu). Na abaxiální straně listu byl obsah kyselin u varianty G i T podobný, pouze u 7. listu jich bylo u varianty G statisticky více ( $p < 0,05$ ). Naopak významně více alkoholů bylo u varianty G a to u všech tří listů (viz obr. 16).

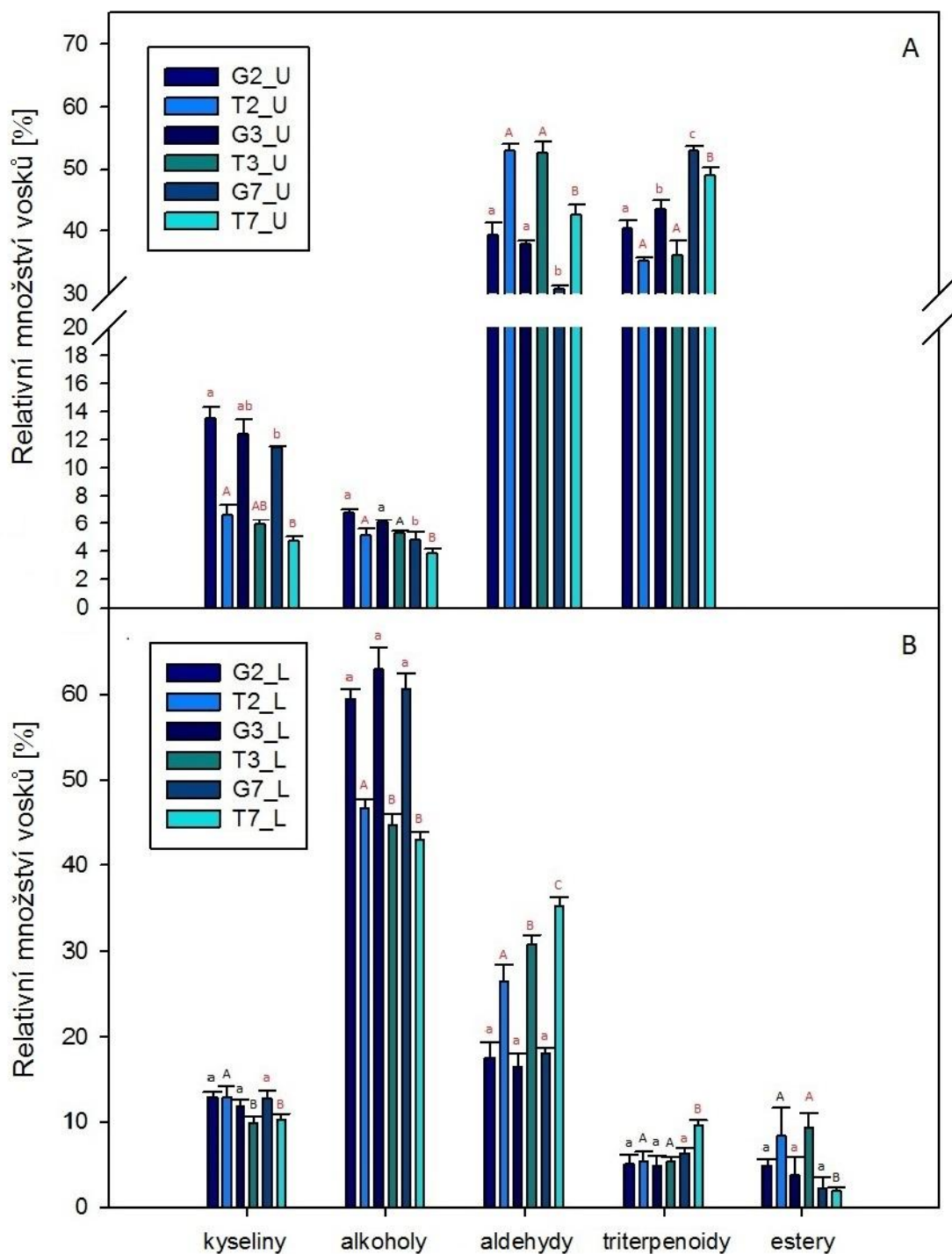


**Obr. 14:** Relativní (A) a absolutní (B) množství extrahovaných vosků rozdělených podle funkčních skupin u *F. elastica*, varianty G (100 % je součet všech funkčních skupin). Malými písmeny jsou označeny hodnoty pro adaxiální (U) stranu listu, velkými písmeny pro abaxiální (L) stranu listu. Písmena zobrazují, zda jsou v rámci skupiny statisticky významné rozdíly (tedy mezi listy odlišného stáří); červená barva zobrazuje statisticky významný rozdíl mezi horní a dolní stranou listu. Chybové úsečky zobrazují směrodatné odchylky (n=4).



**Obr. 15:** Relativní (A) a absolutní (B) množství extrahovaných vosků rozdělených podle funkčních skupin u *F. elastica*, varianty T (100 % je součet všech funkčních skupin). Malými písmeny jsou označeny hodnoty pro adaxiální (U) stranu listu, velkými písmeny pro abaxiální (L) stranu listu. Písmena zobrazují, zda jsou v rámci skupiny statisticky významně rozdíly (tedy mezi listy odlišného stáří); červená barva zobrazuje statisticky významný rozdíl mezi horní a dolní stranou listu. Chybové úsečky zobrazují směrodatné odchylky (n=4).



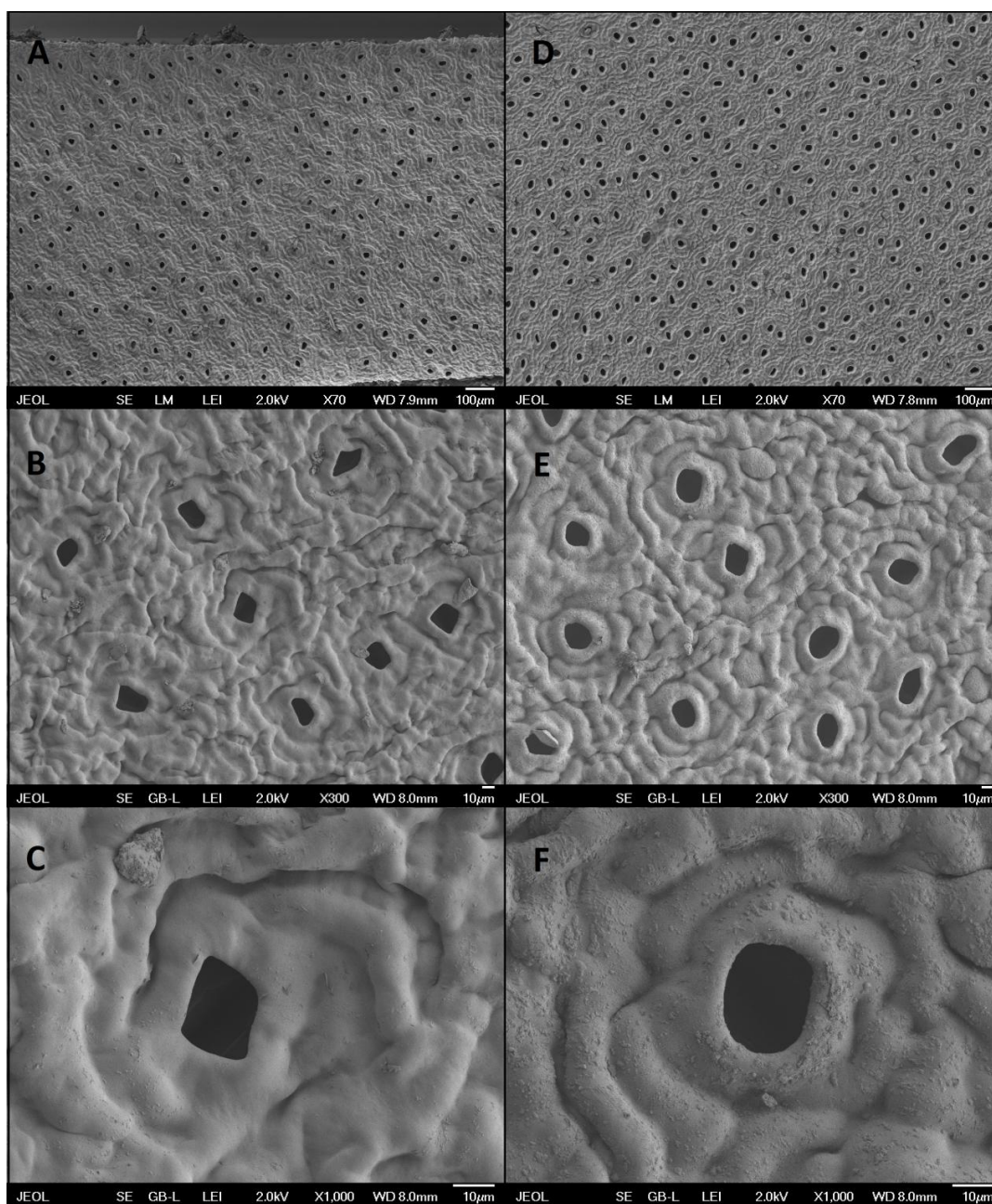


**Obr. 16:** Relativní množství extrahovaných vosků z adaxiální (A) a abaxiální (B) strany listu. Vosky jsou rozděleny podle funkčních skupin. Malými písmeny jsou označeny hodnoty pro listy z rostliny pěstované za nižší teploty a ozáření, varianty G; velkými písmeny hodnoty pro listy rostliny pěstované za vyšší teploty a ozáření, varianty T. Písmena zobrazují, zda jsou v rámci skupiny statisticky významné rozdíly (tedy mezi listy odlišného stáří;  $p < 0,05$ ); červená barva zobrazuje statisticky významný rozdíl mezi variantou T a G. Chybové úsečky zobrazují směrodatné odchylky ( $n=4$ ).



#### 4. 6 Vizualizace povrchu listu *F. elastica* pomocí skenovacího elektronového mikroskopu

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) nám umožňuje detailně zkoumat strukturu povrchu listů. Na následujícím obrázku (č. 17) vidíme abaxiální stranu listu *F. elastica*, varianty G a T. Jsou zde dobře vidět rozdíly v průduchové hustotě a při zvětšení 1000 také pravděpodobně depozity epikutikulárních vosků, které ovšem nevytváří krystalické struktury.

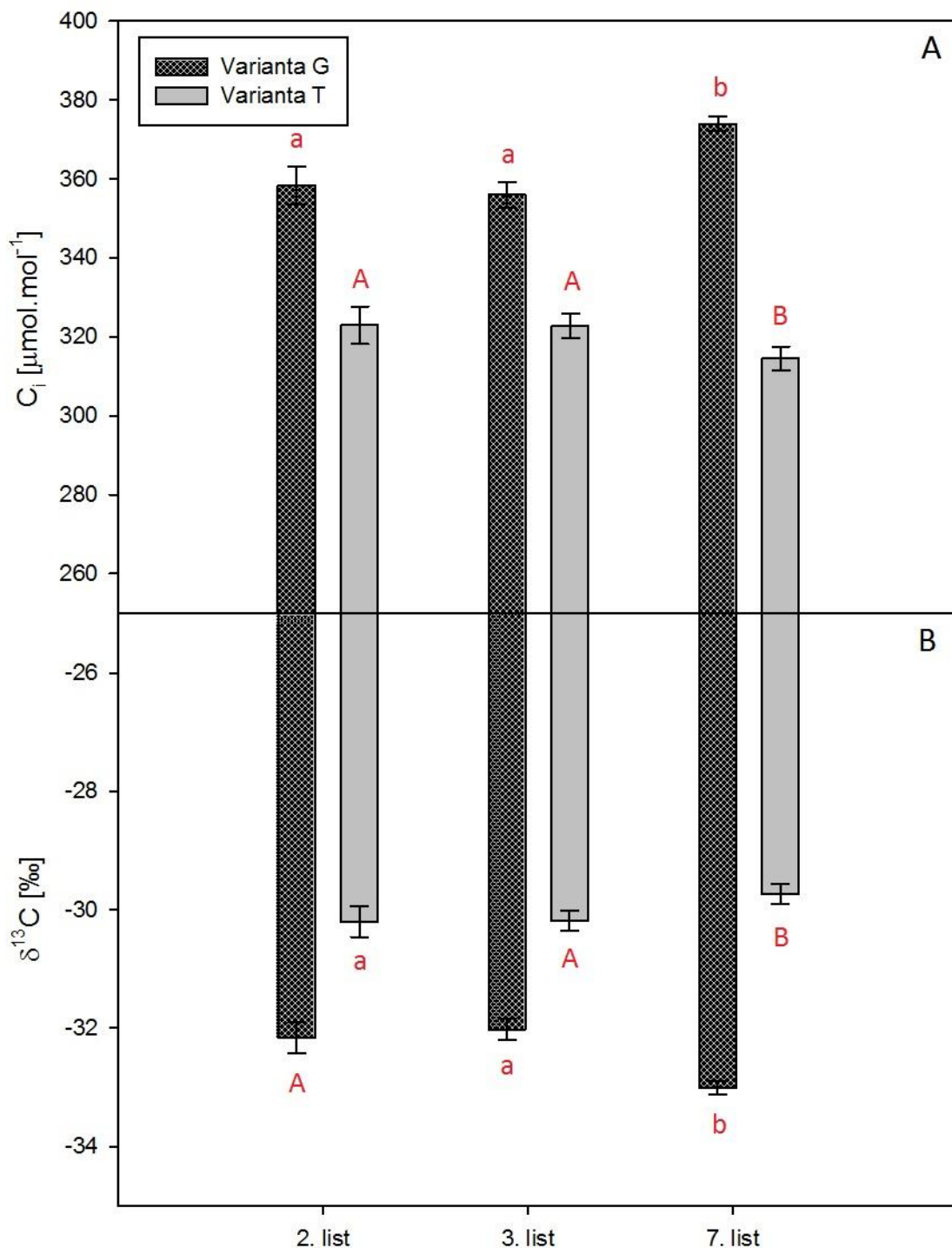


**Obr. 17:** Povrch abaxiální strany listu *F. elastica*, varianty G (A-C) a T (D-F) zobrazený skenovacím elektronovým mikroskopem. Foceno při zvětšení 70 krát (A, D), 100 krát (B, E) a 1000 krát (C, F).

#### 4. 7 Analýza stabilních izotopů uhlíku a výpočet $C_i$

Stanovovala jsem  $\delta^{13}\text{C}$  (dále jen  $\delta$ ) suché hmoty rozemletých listových terčků. U rostlin z přehledové studie bylo  $\delta$  stanoveno z 5 listových terčků, hodnoty  $\delta$  byly v rozmezí -20,767 až -35,380 ‰. Z uvedeného obsahu  $^{13}\text{C}$  v sušině listů ( $\delta_L$ ) jsem vypočítala  $C_i$ , tedy vnitřní koncentraci  $\text{CO}_2$  v době fotoperiody, integrovanou během růstu listu (viz Materiál a metody, vztah 7;  $\delta_a = -8\text{‰}$ ). Vypočítané  $C_i$  bylo v rozmezí 152 až 417  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  (hodnoty  $\delta_L$  a  $C_i$  jsou uvedeny v příloze, tabulka P1).

U rostliny *F. elastica* jsem měřila pro každou variantu 3 listy různého stáří, 8 terčků z každého listu. Listy varianty G byly v průměru o 2,4 ‰ ochuzenější v porovnání s variantou T (rozdíly byly statisticky významné,  $p < 0,05$ ). Vliv stáří listu byl pozorován u G i T varianty pouze u 7. listu (viz obr. 18).  $C_i$  bylo u varianty G v průměru o 43  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  vyšší než u varianty T, největší rozdíl jsem vypočítala u 7. listu (u všech tří listů byl rozdíl statisticky významný,  $p < 0,05$ , viz obr. 18). Průměrné hodnoty  $\delta_L$  a  $C_i$  pro jednotlivé listy jsou uvedeny v příloze (tabulka P2).



**Obr. 18:** Vnitřní koncentrace CO<sub>2</sub> C<sub>i</sub> [μmol·mol<sup>-1</sup>] (A) a obohacení o izotop uhlíku <sup>13</sup>C v listové tkáni (oproti VPDB standardu), δ<sup>13</sup>C [‰] (B) u varianty G (šrafované sloupečky) a varianty T (šedé sloupečky). Analyzována byla pro každou skupinu sušina z 8 listových terčíků o průměru 12 mm. Pro výpočet C<sub>i</sub> byl použit vztah 7. Malými písmeny je znázorněno statistické hodnocení rozdílů u listů z varianty G, velkými písmeny u varianty T. Červené písmo označuje statisticky významný rozdíl mezi variantou G a T pro daný list (p < 0,05; n=8). Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.

#### 4. 8 Výpočet poklesu koncentrace CO<sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou listu

Obsah izotopu uhlíku <sup>13</sup>C jsem měřila v kutikule (kutikulární membráně včetně vosků) a kutikulárních voscích izolovaných zvláště z adaxiální a abaxiální strany listu. U přehledové studie byl rozsah hodnot δ<sup>13</sup>C -40,3 až -21,9 ‰ při měření z celé kutikuly a -38,8 až -31,2 ‰ při měření z kutikulárních vosků. Adaxiální kutikula byla v obsahu <sup>13</sup>C obohacenější v porovnání se stranou abaxiální v necelé polovině případů, u kterých byl také poměr koncentrace CO<sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou listu (poměr  $C_d/C_b$ ) počítaný podle vztahu 8 (viz Materiály a metody) menší než 1. Při analýze extrahovaných kutikulárních vosků byla adaxiální strana obohacena asi ve 2/3 případů, ve kterých byl opět detekovatelný pokles koncentrace  $C_d/C_b$  (viz tabulka 2).

U rostliny *F. elastica* byly všechny vzorky varianty T (kromě spodní strany 3. listu) statisticky průkazně ( $p < 0,05$ ) obohaceny o <sup>13</sup>C oproti variantě G (stejně jako sušina celého listu) a to o 2,17 až 3,55 ‰ u kutikul a o 0,19‰ (statisticky neprůkazný výsledek u 3. listu) až 3,36 ‰ u vosků. Kutikuly i extrahované kutikulární vosky byly v průměru o 1,22 ‰ ochuzenější v množství <sup>13</sup>C v porovnání s celými listovými terčíky (t-test,  $p < 0,05$ ), s výjimkou vosků extrahovaných ze 3. listu varianty G, kde k ochuzení nedošlo. Všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Obohacení adaxiální strany listu v obsahu <sup>13</sup>C bylo u obou variant minimální, nebo byla oproti abaxiální straně dokonce ochuzena. Poměr  $C_d/C_b$  jsem opět počítala jak z izotopového složení celých kutikul, tak z izotopového složení extrahovaných kutikulárních vosků. Mezi variantami G a T v této charakteristice nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (tabulka 3).

**Tab. 2:** Hodnoty relativního obsahu  $^{13}\text{C}$  měřené v celé kutikule a v extrahovaných kutikulárních voscích izolovaných z 15 druhů hypostomatických rostlin. Poměr  $C_d/C_b$ , tedy výpočet poklesu koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi abaxiální a adaxiální stranou listu, je počítán podle vztahu 8 (viz Materiál a metody),  $n=1$ .

	$\delta^{13}\text{C}$ v kutikule		$\delta^{13}\text{C}$ v kutikulárních voscích		$C_d/C_b$	
	adaxiální	abaxiální	adaxiální	abaxiální	z kutikul	z vosků
<i>Zamioculcas zamiifolia</i>	-33,790	-35,028	-38,838	-35,678	0,952	1,147
<i>Brachychiton populneum</i>	-32,922	-32,847	-37,484	-37,594	1,003	0,996
<i>Scindapsus aureus</i>	-30,896	-30,361	-31,494	-31,954	1,022	0,982
<i>Ficus benjamina</i>	-29,261	-29,656	-33,437	-34,299	0,984	0,965
<i>Ficus elastica</i>	-32,265	-32,850	-34,083	-34,844	0,978	0,971
<i>Tradescantia spathaceae</i>	-34,350	-32,425	-36,687	-36,084	1,071	1,021
<i>Ficus binnendijkii</i>	-32,390	-30,944	-31,465	-32,913	1,061	0,945
<i>Passiflora edulis</i>	-32,355	-34,995	-36,425	-35,023	0,905	1,059
<i>Ficus cyathistipula</i>	-34,055	-34,237	-35,793	-34,530	0,993	1,053
<i>Scadoxus multiflorus</i>	-28,962	-29,776	-32,074	-32,282	0,966	0,991
<i>Aglaonema commutatum</i>	-38,597	-40,260	-38,352	-36,536	0,949	1,063
<i>Schefflera arboricola</i>	-35,062	-33,144	-35,145	-35,704	1,086	0,977
<i>Euphorbia leuconeura</i>	-36,069	-35,099	-37,642	-35,982	1,040	1,070
<i>Pandanus veitchii</i>	-31,743	-30,383	-36,050	-39,054	1,053	0,900
<i>Hoya carnosa</i>	-23,177	-21,921	-31,241	-32,825	1,085	0,910

**Tab. 3:** Průměrné hodnoty relativního obsahu  $^{13}\text{C}$  měřené v celé kutikule a v extrahovaných kutikulárních voscích izolovaných z *F. elastica*, varianty G a T. Poměr  $C_d/C_b$ , tedy výpočet poklesu koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi abaxiální a adaxiální stranou listu, je počítán podle vztahu 8 (viz Materiál a metody). Uvedeny jsou průměry±standardní odchylky. Červeně jsou zobrazeny statisticky významné rozdíly mezi variantou G a T ( $n=4$ ; u vosků ze vzorku T\_7, spodní strany, je  $n=2$  a u vosků ze vzorku G\_3, spodní strany, je  $n=3$ ).

		$\delta^{13}\text{C}$ v kutikule		$\delta^{13}\text{C}$ v kutikulárních voscích		$C_d/C_b$	
		adaxiální	abaxiální	adaxiální	abaxiální	z kutikul	z vosků
Varianta G	2. list	-33,79±0,40	-33,73±0,21	-32,78±0,33	-32,76±0,09	1,002±0,011	1,001±0,010
	3. list	-33,19±0,30	-33,42±0,51	-33,03±0,22	-32,28±1,17	0,992±0,015	1,044±0,042
	7. list	-34,53±0,22	-34,45±0,15	-34,36±0,47	-33,72±1,05	1,003±0,004	1,025±0,055
Varianta T	2. list	-31,34±0,18	-31,13±0,12	-31,83±0,22	-31,53±0,34	1,008±0,007	1,012±0,022
	3. list	-31,01±0,80	-31,04±0,58	-32,02±0,19	-32,10±0,26	0,999±0,011	0,997±0,008
	7. list	-30,98±0,13	-30,99±0,26	-31,00±0,18	-31,46±0,55	0,999±0,006	0,998±0,02

## 5. Diskuse

Primární karboxylační enzym  $C_3$  rostlin, Rubisco, funguje při současné atmosférické koncentraci oxidu uhličitého z méně než jedné poloviny své maximální kapacity. Difuze oxidu uhličitého z atmosféry skrz průduchy a mezofyl, tedy mezibuněčný prostor a buněčnou stěnu, cytoplazmu a obaly chloroplastu, má pro rostliny zásadní význam. Nedostatečná rychlost transportu je limitující pro rychlost asimilace  $CO_2$  a tím i pro růst rostlin. V současné době je toho relativně mnoho známo o regulaci průduchové vodivosti ( $g_s$ ), a jejím vlivu na tok plynů (tedy ne jen  $CO_2$ , ale také vodní páry), avšak mezofylová vodivost ( $g_m$ ) je stále nedostatečně prozkoumaná. Již překonaná je původní domněnka, že je  $g_m$  nekonečně velká, jak se pro jednoduchost předpokládalo při konstrukci matematických modelů fotosyntézy v 80-tých letech minulého století (Farquhar et al., 1980). Naopak je již obecně přijímán koncept dynamiky a plasticity ve velikosti  $g_m$ , po jejichž příčinách a především regulacích se stále pátrá. Velké úsilí je věnováno části difuzní dráhy v kapalně fázi (v buněčné stěně a uvnitř buněk,  $g_{liq}$ ) a roli anhydrázy kyseliny uhličité (CA) či aquaporinů. Méně je zkoumaná mezofylová vodivost v plynné fázi ( $g_{ias}$ ), tedy transport  $CO_2$  skrz mezibuněčné prostory. Tato část mezofylové vodivosti je často považovaná za neměřitelně velkou; obecně se předpokládá, že výraznější roli hraje u listů tlustších a s větším množstvím listové sušiny na jednotku plochy ( $LMA$ ) a u hypostomatických listů (Flexas et al., 2008; Niinemets et al., 2009). Nicméně dosud neexistuje žádný spolehlivý a rychlý způsob, který by  $g_{ias}$  kvantifikoval.

Za účelem kvantifikace  $g_{ias}$  při transportu  $CO_2$  listem odvodil Šantrůček a kol. (nepublikováno) vztah pro výpočet poklesu koncentrace  $CO_2$  napříč mezofylem mezi abaxiální a adaxiální stranou listu ( $C_d/C_b$ ) založený na izotopové frakcionaci uhlíku. Frakcionace je měřena z izotopového složení kutikuly nebo kutikulárních vosků izolovaných z opačných stran listu (viz Materiál a metody, vztah 8). V rámci pilotní studie, kdy bylo analyzováno 39 hypostomatických rostlinných druhů, bylo pozorováno obohacení adaxiální strany v množství  $^{13}C$  a tedy pokles koncentrace  $CO_2$  v mezibuněčných prostorech u 70 % případů (Šantrůček et al., nepublikovaná data). Moje práce zahrnuje přehledovou studii na dalších 15 druzích hypostomatických rostlin, u kterých ale došlo k obohacení adaxiální strany jen ve 47 % případů při měření  $\delta^{13}C$  celé kutikuly a v 60 % případů při měření  $\delta^{13}C$  z extrahovaných kutikulárních vosků. V těchto případech byl průměrný pokles koncentrace  $CO_2$  mezi adaxiální a abaxiální stranou listu 4 %. Tento pokles je poměrně malý, v porovnání např. se studií Parkhursta a kol.

(1988), kdy byl naměřený pokles koncentrace  $\text{CO}_2$  u amfistomatického listu 0 až 5,7 %; a Parkhursta a Motta (1990), kteří naměřili u hypostomatických rostlin pokles koncentrace  $\text{CO}_2$  v průměru 12 %.

U fikovníku pryžodárného (*F. elastica*) jsem obohacení adaxiální strany listu (a pokles koncentrace  $C_d/C_b$ ) pozorovala také, a byl proto vybrán pro detailnější studii vlivu anatomické struktury listu na transport  $\text{CO}_2$  listem a případné změny v transportních odporech.

### 5. 1. Anatomické vlastnosti listů *F. elastica*, varianty G a T

Variabilita ve struktuře listů byla navozena pěstováním *F. elastica* po dobu několika let při odlišné ozáření a teplotě. Varianta T (*Top*), pěstovaná za vyšší ozáření a teploty, měla simulovat slunné listy rostoucí v horních patrech subtropického lesa, kde se *F. elastica* přirozeně vyskytuje, a varianta G (*Ground*), pěstovaná za nižší ozáření a teploty, zase stinné listy rostoucí v podrostu. Změnu ve stavbě listů jsem pozorovala na souboru snadno stanovitelných anatomických vlastností: tloušťka listu ( $d$ ) a množství sušiny na jednotku plochy ( $LMA$ ), průduchová hustota ( $SD$ ), průduchový index ( $SI$ ) a anatomické vlastnosti kutikuly.

Tloušťka listu a  $LMA$  u varianty s vyšší ozáření (T) vykazovaly zvýšené hodnoty ve srovnání s variantou G. Jde o typickou reakci slunného listu (Dengler, 1980). Také  $SD$  i  $SI$  byly u rostliny pěstované při vyšší ozáření větší (kromě  $SI$  u 7. listu), což koresponduje s údaji v literatuře (Schoch et al., 1980; Allard et al., 1991; Furukawa, 1997). Tyto výsledky naznačují, že vývoj průduchů by mohl být propojen s poklesem koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu,  $C_i$ , což odpovídá výzkumu Šantrůčka a kol (2014). Varianta T je obohacená o  $^{13}\text{C}$  v porovnání s variantou G, má tedy menší  $C_i$  vypočtenou z izotopů (viz dále) a současně i větší  $SD$ .  $SI$  není ovlivněn tak výrazně,  $C_i$  pravděpodobně moduluje velikost epidermálních buněk (včetně průduchů) spíše než samotnou vývojovou linii průduchů.

Podmínky pěstování navodily změny i u funkčních vlastností listů, které byly kvantifikovány pomocí gazometrického měření. Maximální rychlost fotosyntézy ( $A_{max}$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) byla u varianty G přibližně poloviční oproti variantě T a to při měření  $A/C_i$  křivek i světelných křivek (viz obr. P1 a P2 v přílohách). Všechny tyto rysy ukazují, že *F. elastica* reaguje na různou ozáření PAR dlouhodobou aklimací anatomických parametrů listu, které mohou potenciálně ovlivnit „průchodnost“ listu pro  $\text{CO}_2$ : zvětšení tloušťky a hmotnosti



jednotkové plochy listu pravděpodobně ztíží zásobení CO<sub>2</sub> přes průduchy lokalizovanými výhradně na spodní straně listu.

## 5. 2. Izotopové složení listu a kutikuly

Metoda měření poklesu koncentrace CO<sub>2</sub> napříč listem, kterou jsem testovala, je založená na měření izotopového složení tří listových komponent: adaxiální kutikuly (nebo adaxiálních vosků), abaxiální kutikuly (nebo abaxiálních vosků) a celkové suché hmoty listu. Analyzovala jsem tedy ochuzení celkové biomasy listu (terčíku), izolovaných kutikul i extrahovaných kutikulárních vosků o izotop <sup>13</sup>C oproti standardu ( $\delta^{13}\text{C}$ ). U všech tří typů vzorků byl obsah <sup>13</sup>C relativně vyšší (tzn. méně záporná hodnota  $\delta$ ) u varianty T než u varianty G, což bylo pravděpodobně dáno vyšší ozářeností a tím i větší rychlostí asimilace CO<sub>2</sub> u varianty T. Nezávislá gazometrická měření už od 80-tých let opakovaně prokazovala, že  $\delta_L$  silně koreluje s poměrem vnitřní listové a atmosférické koncentrace CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) (Cernusak et al., 2013), a potvrzovala tak platnost vztahu 7 (viz Materiál a metody). Obohacení listů slunné varianty (T) o <sup>13</sup>C proto ukazuje na statisticky významně nižší  $C_i$  než u varianty G.

Listová kutikula je extracelulární produkt epidermis, který bývá ochuzen v množství <sup>13</sup>C v porovnání se sušinou celého listu. U C<sub>3</sub> rostlin se ochuzení pohybuje v rozmezí 1,9 až 9 % (Collister et al., 1994; Chikaraishi and Naraoka, 2001). V mé přehledové studii se celá kutikula lišila o -1,37 (v tomto případě šlo o obohacení) až 6,14 ‰ (s průměrnou hodnotou 2,58 ‰) a extrahované vosky o 1,16 až 12,06 ‰ (s průměrnou hodnotou 5,30 ‰). U druhu *F. elastica* bylo průměrné ochuzení celé kutikuly 1,25 ‰ a extrahovaných vosků 1,19 ‰. Ochuzení kutikuly a jejich komponent vzhledem k celkové biomase listu je zapříčiněno izotopovou frakcionací během oxidace pyruvátu na acetyl-koenzym A a během biosyntézy jednotlivých lipidických frakcí (Deniro and Epstein, 1977; Chikaraishi, 2003; Chikaraishi et al., 2004b; a).

Kutikulární matrix se syntetizuje již v začátku vývoje listu a od dospělosti se po zbytek ontogeneze neobnovuje (Riederer and Schonherr, 1988), na druhou stranu kutikulární vosky jsou neustále narušovány větrem nebo omývány deštěm a dochází tak k jejich neustálé obměně. Čas celkové obnovy vosků byl skupinou Gao a kol. (2012) stanovena na 2-3 dny pro C<sub>16</sub> a C<sub>18</sub> kyseliny, 5-16 dní pro vosky s uhlíkovým řetězcem délky C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub> a 71-128 dní pro složku vosků s velmi dlouhým (VLC) řetězcem (C<sub>27</sub> až C<sub>31</sub>); měření probíhalo na bojínku lučním, *Phleum pratense*. Složení nově syntetizovaných vosků se mění v reakci na ontogenetický vývoj listu



(Jetter and Schaffer, 2001) či na sezónní podmínky (Kerfourn and Garrec, 1992). Z tohoto důvodu jsem se kromě celé kutikuly zabývala také extrahovanými kutikulárními vosky.

Dva hlavní předpoklady pro použití vztahu 8 pro výpočet poklesu koncentrace CO<sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou listu jsou: i) syntéza kutikuly a kutikulárních vosků se děje z prekurorů (asimilátů) vytvořených v chloroplastech lokalizovaných v buňkách v blízkosti dané kutikuly a ii) post-fotosyntetická frakcionace není závislá na straně listu. Proto bylo nutné zjistit složení kutikulárních vosků zvláště pro adax- a abaxiální stranu listu. Vyhodnocením GC/MS jsem zjistila, že složení vosků se liší mezi variantou G a T hlavně kvantitou jednotlivých složek, avšak adaxiální a abaxiální strana listu se liší také kvalitou. Především na horní straně listu bylo u obou variant přibližně 10x více triterpenoidů, na spodní straně se nacházela skupina esterů (které jsem na horní straně neidentifikovala) a jinak převládaly alkoholy (viz obr. 13-16).

Jak bylo zmíněno výše, celá kutikula byla ochuzena v množství <sup>13</sup>C oproti listové tkáni, avšak míra ochuzení se může mezi jednotlivými složkami vosků lišit podle dráhy syntézy, a tím i míry frakcionace (Chikaraishi et al., 2004a). Náš model ale předpokládá stejnou izotopovou frakcionaci na adaxiální a abaxiální straně listu, proto by bylo třeba zjistit δ<sup>13</sup>C jednotlivých složek směsi kutikulárních vosků. Stanovení látkově specifické δ<sup>13</sup>C bude předmětem práce v budoucnu.

### 5. 3. Tloušťka kutikuly a její propustnost pro vodu

Hlavní cestou výměny plynů mezi rostlinou a atmosférou jsou průduchy, které zprostředkují 94 – 99,7 % výměny vodní páry. Při nedostatku vody jsou průduchy zavřené a přežití rostliny dále záleží na propustnosti kutikuly, kudy uniká přibližně 2 – 29 % vody (Holmgren et al., 1965). Přes kutikulu může být transportován také CO<sub>2</sub>, ale v mnohem menší míře než vodní pára. Podle měření Boyera a kol. (1997) na intaktním listu vinné révy (*Vitis vinifera* L.) šlo o 0,112 až 0,400 mmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (což bylo 2,5 až 13 % toku vodní páry). Přestože vztah propustnosti kutikuly pro CO<sub>2</sub> ( $P_c$ ) a H<sub>2</sub>O ( $P_w$ ) není, pokud vím znám, zajímalo mě, jestli vnější podmínky, v nichž byl *F. elastica* pěstován, tento parametr změnil. Propustnost  $P_w$  (pro jednoduchost označována dále pouze  $P$ ) byla u varianty T nižší, avšak tento rozdíl nebyl statisticky významně odlišný od varianty G ( $p > 0,05$ ). I když v tomto případě bylo  $P$  vyšší u varianty s tenčí kutikulou a menším množstvím kutikulárních vosků (viz obr. 10, 12 a 13), nejedná se o obecnou korelaci (Riederer and Schreiber, 2001). Nebyla prokázána ani závislost hodnoty  $P$  na složení kutikulárních vosků (Geyer and Schonherr, 1990; Riederer and Schneider,

1990), ale zdá se, že velký vliv má ultrastruktura kutikuly a v ní uložené intrakutikulární vosky (Kerstiens 1994). *F. elastica* má jednu z nejméně pro vodu propustných kutikul mezi rostlinami z různých funkčních skupin rostlin (např. (Riederer and Schreiber, 2001). Tento trend může být odvozen od životní strategie: v přirozených podmínkách se fíkovník první část života často vyvíjí epifiticky, je tedy omezený v dostupnosti vody a současně vystaven vysoké ozáření PAR. Nově vyrůstající listy musí proto být chráněny jak před vysokou ozáření, tak před vysycháním.

#### **5. 4. Pokles koncentrace CO<sub>2</sub> mezi abaxiální a adaxiální stranou listu**

Přestože pilotní pokusy měření poklesu koncentrace oxidu uhličitého mezi abaxiální a adaxiální stranou listu vypadaly slibně (ukazovaly na 1-9 % pokles koncentrace), moje studie na rostlině *F. elastica* pokles (tj. hodnoty  $C_b/C_d$  nižší než 1) neprokázala. U varianty G výrazná změna koncentrace nebyla příliš očekávána, rostlina vyrůstala v prostředí s velmi nízkou ozáření PAR (do cca 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), čímž byla silně limitována rychlost fotosyntézy (viz světelné a CO<sub>2</sub> závislosti fotosyntézy na obr. P1 a P2). Větší pokles koncentrací jsem očekávala u varianty T (ozáření do cca 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), avšak ani u ní nebyl izotopovou analýzou a výpočtem detekován. Hodnoty  $C_b/C_d$  nebyly statisticky průkazně odlišné od 1 pro G ani T rostlinu. V mnoha případech byl rozdíl  $\delta_{AB}-\delta_{AD}$  dokonce v pozitivních hodnotách, a z toho vyplývá, že  $C_d$  byla větší než  $C_b$  (viz tab. 3). Takový výsledek by indikoval průměrný čistý tok CO<sub>2</sub> směrem z listu do atmosféry, což je v rozporu s růstem listu, potažmo celé rostliny. Příčinou zdánlivé absence koncentračního gradientu napříč listem *F. elastica* by mohla být:

i) Nedostatečná ozáření u varianty T. Přirozeně roste *F. elastica* v tropických a subtropických oblastech, kde je maximální ozáření přibližně 2000 – 2500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a rostlina tak dosahuje vyšší  $A_{max}$ . Rychlejší karboxylací by mohlo docházet k vytvoření většího gradientu koncentrací CO<sub>2</sub> a to jak mezi  $C_a$  a  $C_i$ , ale také mezi  $C_b$  a  $C_d$ .

ii) Nejsou splněny předpoklady, které jsou zahrnuty v odvození vztahu 8, tedy kutikula a kutikulární vosky nejsou syntetizovány z asimilátů vytvořených v chloroplastech lokalizovaných v blízkosti dané kutikuly, post-fotosyntetická diskriminace během syntézy prekurzorů kutikuly a kutikulárních vosků je závislá na straně listu, nebo průměrná  $\delta$  CO<sub>2</sub> ve vzduchu uvnitř listu se výrazně liší od  $\delta$  CO<sub>2</sub> ve vzduchu obklopujícího buňky palisádového parenchymu na bezprůduchové straně listu ( $\delta_d$ ), čímž mohlo dojít k podhodnocení změny koncentrace CO<sub>2</sub> až o polovinu.

**iii)** Obohacení adaxiální strany listu o  $^{13}\text{C}$  je zmenšeno vlivem refixace  $\text{CO}_2$  po fotorespiraci a respiraci během dne. Fotorespirace je způsobená oxygenázovou aktivitou enzymu RUBISCO, na rozdíl od karboxylázy dává oxygenáza vznik jedné molekule fosfoglycerátu (3C) a jedné molekule fosfoglykolátu (2C). Fosfoglycerát je po redukcii zapojen zpět do Calvinova cyklu, fosfoglykolát se v asimilačních buňkách listů dále zpracovává složitým cyklem reakcí (tzv. fotorespiračním cyklem) během kterého se  $\frac{3}{4}$  uhlíku obsaženého ve fosfoglykolátu vrací do Calvinova cyklu, ale u  $\frac{1}{4}$  dochází ke ztrátám v podobě úniku  $\text{CO}_2$  (Ogren, 1984). Refixace uvolněné molekuly  $\text{CO}_2$  je pravděpodobnější na adaxiální straně, protože molekula by musela difundovat přes celý list až na průduchovou stranu, na rozdíl od molekuly uvolněné na abaxiální straně, blízko průduchům. Respirovaný  $\text{CO}_2$  je oproti vnější atmosféře silně ochuzený v množství  $^{13}\text{C}$ , čímž vzniká zdroj ochuzení adaxiální kutikuly.

Pro vyloučení příčiny i) by bylo užitečné mít vzorek listu z rostliny *F. elastica* rostoucí v přirozeném prostředí, tedy v tropické oblasti. Vliv post-fotosyntetické frakcionace při syntéze jednotlivých složek kutikulárních vosků (bod ii) by mohl být lépe definován po analýze obsahu  $^{13}\text{C}$  separátně pro každou frakci vosků. A míra vlivu refixace  $\text{CO}_2$  (bod iii) by mohla být minimalizována snížením fotorespirace pěstováním rostlin v atmosféře s nízkou koncentrací  $\text{O}_2$  (2 %) nebo farmakologickým zablokováním glycin dekarboxylázy (zapojené ve fotorespiračním cyklu, katalyzuje dekarboxylaci glycinu v mitochondriích). Avšak obě varianty by byly velmi časově i finančně náročné.

Vyloučením těchto možných příčin bych také mohla konstatovat, že napříč hypostomatickým listem se nevytváří měřitelný gradient koncentrací  $\text{CO}_2$ . Rostlina se možná „brání“ vytvoření většího gradientu např. navýšením počtu průduchů na nově vyrostlých listech (viz dvojnásobná *SD* u varianty T rostliny *F. elastica*, pěstované při vyšší ozáření PAR). Tak by mohla být zajištěna dostatečná dodávka  $\text{CO}_2$  vzhledem k požadavku, které mají chloroplasty i na straně listu vzdálené od průduchů.

## 6. Závěr

- i. Hypotézu, že napříč hypostomatickým listem existuje gradient koncentrace  $\text{CO}_2$  detekovatelný z obsahu izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  v kutikule nebo kutikulárních voscích, jsem nepotvrdila. Rozdíl mezi koncentrací  $\text{CO}_2$  v mezibuněčném prostoru na adaxiální a abaxiální straně listu nebyl statisticky průkazný ani u přehledové studie, ani u druhu *F. elastica*.
- ii. Při dlouhodobě vyšší rychlosti fotosyntézy jsem očekávala zvýšený gradient koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi abaxiální a adaxiální stranou listu, který by byl detekovatelný v izotopovém složení kutikuly a kutikulárních vosků. Takto změněný gradient by ověřil kvalitativní model diskriminace  $^{13}\text{CO}_2$  uvnitř listu a z něj odvozený výpočet poklesu koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi abaxiální a adaxiální stranou listu. Změnu gradientu jsem nepozorovala, přestože rychlost fotosyntézy byla u varianty T, tedy rostliny *F. elastica* rostoucí při vyšší ozáření PAR, přibližně dvojnásobná v porovnání s variantou G, rostoucí při nižší ozáření PAR. Příčina selhání modelu by mohla být v odlišném zastoupení jednotlivých složek vosků na adaxiální a abaxiální straně listu a v látkově specifické frakcionaci při jejich syntéze.
- iii. V rámci skrínigové studie proběhlo měření na 15 druzích hypostomatických rostlin. Pokles koncentrace mezi abaxiální ( $C_b$ ) a adaxiální ( $C_d$ ) stranou listu stanovený z izotopového složení kutikul a kutikulárních vosků byl detekován pouze ve 47 % případů při měření  $\delta^{13}\text{C}$  celé kutikuly a v 60 % případů při měření  $\delta^{13}\text{C}$  z extrahovaných kutikulárních vosků. Průměrný pokles koncentrace  $\text{CO}_2$  u těchto rostlin byl 4 %.
- iv. Na vybraném modelovém druhu *Ficus elastica* byla navozena variabilita v anatomii listu mezi rostlinou rostoucí při nižší ozáření PAR, variantou G, a rostlinou rostoucí při vyšší ozáření PAR, variantou T. Listy varianty T vykazovaly vlastnosti typické pro rostliny adaptované na vyšší ozáření: byly tlustší ( $d$ ), měly větší množství listové sušiny na jednotku plochy listu ( $LMA$ ), měly tlustší kutikulu ( $d_c$ ) a vyšší průduchovou hustotu ( $SD$ ). Pokles koncentrace mezi  $C_b$  a  $C_d$  jsem izotopovou metodou nedetekovala ani u jedné z těchto variant.

## 7. Seznam citovan $\acute{e}$ literatury

- Allard G, Nelson CJ, Pallardy SG.** 1991. Shade Effects on Growth of Tall Fescue .1. Leaf Anatomy and Dry-Matter Partitioning. *Crop Science* **31**, 163-167.
- Barthlott W, Neinhuis C.** 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **202**, 1-8.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H.** 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **126**, 237-260.
- Baur P, Stulle K, Schonherr J, Uhlig B.** 1998. Absorption of UV-B to blue light radiation by leaf cuticles of selected crop plants. *Gartenbauwissenschaft* **63**, 145-152.
- Beerling DJ, Lomax BH, Royer DL, Upchurch GR, Kump LR.** 2002. An atmospheric pCO<sub>2</sub> reconstruction across the Cretaceous-Tertiary boundary from leaf megafossils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7836-7840.
- Berger D, Altmann T.** 2000. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* **14**, 1119-1131.
- Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S, Long SP.** 2002. Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology* **130**, 1992-1998.
- Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, Kunst L, Wu XW, Yephremov A, Samuels L.** 2007. Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant Journal* **52**, 485-498.
- Boccalandro HE, Rugnone ML, Moreno JE, Ploschuk EL, Serna L, Yanovsky MJ, Casal JJ.** 2009. Phytochrome B Enhances Photosynthesis at the Expense of Water-Use Efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **150**, 1083-1092.
- Bongi G, Loreto F.** 1989. Gas-Exchange Properties of Salt-Stressed Olive (*Olea-Europea* L) Leaves. *Plant Physiology* **90**, 1408-1416.
- Boom A, Damste JSS, de Leeuw JW.** 2005. Cutan, a common aliphatic biopolymer in cuticles of drought-adapted plants. *Organic Geochemistry* **36**, 595-601.
- Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD.** 1997. CO<sub>2</sub> and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology* **114**, 185-191.

- Briggs WR, Christie JM.** 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204-210.
- Buckley TN, Mott KA, Farquhar GD.** 2003. A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant Cell and Environment* **26**, 1767-1785.
- Buchholz A, Schonherr J.** 2000. Thermodynamic analysis of diffusion of non-electrolytes across plant cuticles in the presence and absence of the plasticiser tributyl phosphate. *Planta* **212**, 103-111.
- Buschhaus C, Jetter R.** 2011. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany* **62**, 841-853.
- Casson SA, Franklin KA, Gray JE, Grierson CS, Whitelam GC, Hetherington AM.** 2009. phytochrome B and PIF4 Regulate Stomatal Development in Response to Light Quantity. *Current Biology* **19**, 229-234.
- Cernusak LA, Ubierna N, Winter K, Holtum JAM, Marshall JD, Farquhar GD.** 2013. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist* **200**, 950-965.
- Collatz GJ, Ball JT, Grivet C, Berry JA.** 1991. Physiological and Environmental-Regulation of Stomatal Conductance, Photosynthesis and Transpiration - a Model That Includes a Laminar Boundary-Layer. *Agricultural and Forest Meteorology* **54**, 107-136.
- Collister JW, Rieley G, Stern B, Eglinton G, Fry B.** 1994. Compound-Specific Delta-C-13 Analyses of Leaf Lipids from Plants with Differing Carbon-Dioxide Metabolisms. *Organic Geochemistry* **21**, 619-627.
- Dengler NG.** 1980. Comparative Histological Basis of Sun and Shade Leaf Dimorphism in Helianthus-Annuus. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **58**, 717-730.
- Deniro MJ, Epstein S.** 1977. Mechanism of Carbon Isotope Fractionation Associated with Lipid-Synthesis. *Science* **197**, 261-263.
- Dennis MW, Kolattukudy PE.** 1991. Alkane Biosynthesis by Decarbonylation of Aldehyde Catalyzed by a Microsomal Preparation from Botryococcus-Braunii. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **287**, 268-275.
- Dow GJ, Bergmann DC.** 2014. Patterning and processes: how stomatal development defines physiological potential. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 67-74.

- Dow GJ, Berry JA, Bergmann DC.** 2014. The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **201**, 1205-1217.
- During H.** 2003. Stomatal and mesophyll conductances control CO<sub>2</sub> transfer to chloroplasts in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **42**, 65-68.
- Edwards D.** 1993. Cells and tissues in the vegetative sporophytes of early land plants. *New Phytologist* **125**, 225-247.
- Ellsworth DS, Reich PB.** 1993. Canopy Structure and Vertical Patterns of Photosynthesis and Related Leaf Traits in a Deciduous Forest. *Oecologia* **96**, 169-178.
- Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I.** 2009. Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2235-2248.
- Evans JR, Terashima I.** 1988. Photosynthetic Characteristics of Spinach Leaves Grown with Different Nitrogen Treatments. *Plant and Cell Physiology* **29**, 157-165.
- Evans JR, vonCaemmerer S.** 1996. Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology* **110**, 339-346.
- Ewbank G, Edwards D, Abbott GD.** 1996. Chemical characterization of Lower Devonian vascular plants. *Organic Geochemistry* **25**, 461-473.
- Farquhar GD, Caemmerer SV, Berry JA.** 1980. A Biochemical-Model of Photosynthetic CO<sub>2</sub> Assimilation in Leaves of C-3 Species. *Planta* **149**, 78-90.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT.** 1989. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 503-537.
- Farquhar GD, Oleary MH, Berry JA.** 1982. On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Inter-Cellular Carbon-Dioxide Concentration in Leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **9**, 121-137.
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmes J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M.** 2007. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant Cell and Environment* **30**, 1284-1298.
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Bota J, Galmes J, Henkle M, Martinez-Canellas S, Medrano H.** 2006a. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist* **172**, 73-82.

- Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, Galmes J, Medrano H.** 2008. Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant Cell and Environment* **31**, 602-621.
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R.** 2006b. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo. *Plant Journal* **48**, 427-439.
- Franks PJ, Beerling DJ.** 2009. Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 10343-10347.
- Frechilla S, Zhu JX, Talbott LD, Zeiger E.** 1999. Stomata from npq1, a zeaxanthin-less arabidopsis mutant, lack a specific response to blue light. *Plant and Cell Physiology* **40**, 949-954.
- Furukawa A.** 1997. Stomatal frequency of *Quercus myrsinaefolia* grown under different irradiances. *Photosynthetica* **34**, 195-199.
- Gao L, Burnier A, Huang YS.** 2012. Quantifying instantaneous regeneration rates of plant leaf waxes using stable hydrogen isotope labeling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **26**, 115-122.
- Geisler M, Nadeau J, Sack FD.** 2000. Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in *Arabidopsis* are disrupted by the too many mouths mutation. *Plant Cell* **12**, 2075-2086.
- Geisler M, Sack FD.** 2002. Variable timing of developmental progression in the stomatal pathway in *Arabidopsis* cotyledons. *New Phytologist* **153**, 469-476.
- Geyer U, Schonherr J.** 1990. The Effect of the Environment on the Permeability and Composition of Citrus Leaf Cuticles .1. Water Permeability of Isolated Cuticular Membranes. *Planta* **180**, 147-153.
- Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodward FI, Schuch W, Heterington AM.** 2000. The HIC signalling pathway links CO<sub>2</sub> perception to stomatal development. *Nature* **408**, 713-716.
- Gupta NS, Collinson ME, Briggs DEG, Evershed RP, Pancost RD.** 2006. Reinvestigation of the occurrence of cutan in plants: implications for the leaf fossil record. *Paleobiology* **32**, 432-449.



- Hanba YT, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I, Katsuhara M.** 2004. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology* **45**, 521-529.
- Haslam TM, Kunst L.** 2013. Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Science* **210**, 93-107.
- Hatch MD, Slack CR.** 1966. Photosynthesis by Sugar-Cane Leaves - a New Carboxylation Reaction and Pathway of Sugar Formation. *Biochemical Journal* **101**, 103-107.
- Heilmeier H, Schulze ED, Fan J, Hartung W.** 2007. General relations of stomatal responses to xylem sap abscisic acid under stress in the rooting zone - A global perspective. *Flora* **202**, 624-636.
- Heredia A.** 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1620**, 1-7.
- Holloway PJ.** 1969. Effects of Superficial Wax on Leaf Wettability. *Annals of Applied Biology* **63**, 145-153.
- Holmgren P, Jarvis PG, Jarvis MS.** 1965. Resistances to Carbon Dioxide and Water Vapour Transfer in Leaves of Different Plant Species. *Physiologia Plantarum* **18**, 557-573.
- Chaerle L, Saibo N, Van der Straeten D.** 2005. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends in Biotechnology* **23**, 308-315.
- Chater CCC, Oliver J, Casson S, Gray JE.** 2014. Putting the brakes on: abscisic acid as a central environmental regulator of stomatal development. *New Phytologist* **202**, 376-391.
- Cheesbrough TM, Kolattukudy PE.** 1984. Alkane Biosynthesis by Decarbonylation of Aldehydes Catalyzed by a Particulate Preparation from *Pisum-Sativum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **81**, 6613-6617.
- Chikaraishi Y.** 2003. Carbon and hydrogen isotopic fractionations during lipid biosyntheses in higher plants. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **67**, A64-A64.
- Chikaraishi Y, Naraoka H.** 2001. Organic hydrogen-carbon isotope signatures of terrestrial higher plants during biosynthesis for distinctive photosynthetic pathways. *Geochemical Journal* **35**, 451-458.
- Chikaraishi Y, Naraoka H, Poulson SR.** 2004a. Carbon and hydrogen isotopic fractionation during lipid biosynthesis in a higher plant (*Cryptomeria japonica*). *Phytochemistry* **65**, 323-330.

- Chikaraishi Y, Naraoka H, Poulson SR.** 2004b. Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry* **65**, 1369-1381.
- Christeller JT, Laing WA, Troughton JH.** 1976. Isotope Discrimination by Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase - No Effect of Temperature or Hco-3(-) Concentration. *Plant Physiology* **57**, 580-582.
- Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He YH, Yu BW, Pravitasari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA, Rose JKC.** 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant Journal* **60**, 363-377.
- Jetter R, Schaffer S.** 2001. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology* **126**, 1725-1737.
- Jiang F, Hartung W.** 2008. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* **59**, 37-43.
- Johnson PR, Ecker JR.** 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review of Genetics* **32**, 227-254.
- Jones HG.** 1973. Moderate Term Water Stresses and Associated Changes in Some Photosynthetic Parameters in Cotton. *New Phytologist* **72**, 1095-1105.
- Kang CY, Lian HL, Wang FF, Huang JR, Yang HQ.** 2009. Cryptochromes, Phytochromes, and COP1 Regulate Light-Controlled Stomatal Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 2624-2641.
- Kerfourn C, Garrec JP.** 1992. Modifications in the Alkane Composition of Cuticular Waxes from Spruce Needles (*Picea-Abies*) and Ivy Leaves (*Hedera-Helix*) Exposed to Ozone Fumigation and Acid Fog - Comparison with Needles from Declining Spruce Trees. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **70**, 861-869.
- Kerstiens G.** 1996. Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1813-1832.
- Kerstiens G, Federholzner R, Lenzian KJ.** 1992. Dry Deposition and Cuticular Uptake of Pollutant Gases. *Agriculture Ecosystems & Environment* **42**, 239-253.
- Kinoshita T, Shimazaki K.** 2001. Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in response to fusicoccin. *Plant and Cell Physiology* **42**, 424-432.

- Kolattukudy P.** 1970. Biosynthetic Relationships among Very Long Chain Hydrocarbons, Ketones, and Secondary Alcohols and Noninvolvement of Alkenyl Glyceryl Ethers in Their Biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **141**, 381-383.
- Kolattukudy PE, Crawford MS, Woloshuk CP, Ettinger WF, Soliday CL.** 1987. The Role of Cutin, the Plant Cuticular Hydroxy Fatty-Acid Polymer, in the Fungal Interaction with Plants. *Acs Symposium Series* **325**, 152-175.
- Kolb CA, Pfundel EE.** 2005. Origins of non-linear and dissimilar relationships between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley. *Plant Cell and Environment* **28**, 580-590.
- Kortscha HP, Hartt CE, Burr GO.** 1965. Carbon Dioxide Fixation in Sugarcane Leaves. *Plant Physiology* **40**, 209-213.
- Krauss P, Markstadter C, Riederer M.** 1997. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell and Environment* **20**, 1079-1085.
- Kunst L, Samuels AL.** 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **42**, 51-80.
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI.** 2001. Plant development - Signals from mature to new leaves. *Nature* **411**, 154-154.
- Lake JA, Woodward FI.** 2008. Response of stomatal numbers to CO<sub>2</sub> and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist* **179**, 397-404.
- Lake JA, Woodward FI, Quick WP.** 2002. Long-distance CO<sub>2</sub> signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 183-193.
- Lawson T.** 2009. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist* **181**, 13-34.
- Lendzian KJ, Kerstiens G.** 1991. Sorption and Transport of Gases and Vapors in Plant Cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **121**, 65-128.
- Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V, Pinot F, Ohlrogge J, Beisson F.** 2009. Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 22008-22013.
- Lolle SJ, Hsu W, Pruitt RE.** 1998. Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**, 607-619.
- Long LM, Patel HP, Cory WC, Stapleton AE.** 2003. The maize epicuticular wax layer provides UV protection. *Functional Plant Biology* **30**, 75-81.

- Matas AJ, Cobb ED, Bartsch JA, Paolillo DJ, Niklas KJ.** 2004. Biomechanics and anatomy of *Lycopersicon esculentum* fruit peels and enzyme-treated samples. *American Journal of Botany* **91**, 352-360.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H.** 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 367-386.
- Messinger SM, Buckley TN, Mott KA.** 2006. Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* **140**, 771-778.
- Monte E, Al-Sady B, Leivar P, Quail PH.** 2007. Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3125-3133.
- Morison JIL, Lawson T.** 2007. Does lateral gas diffusion in leaves matter? *Plant Cell and Environment* **30**, 1072-1085.
- Mott KA.** 1988. Do Stomata Respond to CO<sub>2</sub> Concentrations Other Than Intercellular. *Plant Physiology* **86**, 200-203.
- Mott KA.** 2009. Opinion: Stomatal responses to light and CO<sub>2</sub> depend on the mesophyll. *Plant Cell and Environment* **32**, 1479-1486.
- Mott KA, Oleary JW.** 1984. Stomatal Behavior and CO<sub>2</sub> Exchange Characteristics in Amphistomatous Leaves. *Plant Physiology* **74**, 47-51.
- Nawrath C.** 2006. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 281-287.
- Niinemets U, Diaz-Espejo A, Flexas J, Galmes J, Warren CR.** 2009. Role of mesophyll diffusion conductance in constraining potential photosynthetic productivity in the field. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2249-2270.
- Niinemets U, Kull O, Tenhunen JD.** 2004. Within-canopy variation in the rate of development of photosynthetic capacity is proportional to integrated quantum flux density in temperate deciduous trees. *Plant Cell and Environment* **27**, 293-313.
- Niinemets U, Tenhunen JD.** 1997. A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant Cell and Environment* **20**, 845-866.
- Ogren WL.** 1984. Photorespiration - Pathways, Regulation, and Modification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **35**, 415-442.

- Oleary MH, Rife JE, Slater JD.** 1981. Kinetic and Isotope Effect Studies of Maize Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Biochemistry* **20**, 7308-7314.
- Olsen RL, Pratt RB, Gump P, Kemper A, Tallman G.** 2002. Red light activates a chloroplast-dependent ion uptake mechanism for stomatal opening under reduced CO<sub>2</sub> concentrations in *Vicia* spp. *New Phytologist* **153**, 497-508.
- Osborn JM, Taylor TN.** 1990. Morphological and Ultrastructural Studies of Plant Cuticular Membranes .1. Sun and Shade Leaves of *Quercus Velutina* (Fagaceae). *Botanical Gazette* **151**, 465-476.
- Parkhurst DF.** 1994. Diffusion of CO<sub>2</sub> and Other Gases inside Leaves. *New Phytologist* **126**, 449-479.
- Parkhurst DF, Mott KA.** 1990. Intercellular Diffusion Limits to CO<sub>2</sub> Uptake in Leaves. *Plant Physiology* **94**, 1024-1032.
- Parkhurst DF, Wong SC, Farquhar GD, Cowan IR.** 1988. Gradients of Intercellular CO<sub>2</sub> Levels across the Leaf Mesophyll. *Plant Physiology* **86**, 1032-1037.
- Pighin JA, Zheng HQ, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL.** 2004. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**, 702-704.
- PostBeittenmiller D.** 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 405-430.
- Riederer M.** 1991. Cuticle as Barrier between Terrestrial Plants and the Atmosphere - Significance of Growth-Structure for Cuticular Permeability. *Naturwissenschaften* **78**, 201-208.
- Riederer M, Schneider G.** 1989. Comparative-Study of the Composition of Waxes Extracted from Isolated Leaf Cuticles and from Whole Leaves of Citrus - Evidence for Selective Extraction. *Physiologia Plantarum* **77**, 373-384.
- Riederer M, Schneider G.** 1990. The Effect of the Environment on the Permeability and Composition of Citrus Leaf Cuticles .2. Composition of Soluble Cuticular Lipids and Correlation with Transport-Properties. *Planta* **180**, 154-165.
- Riederer M, Schonherr J.** 1988. Development of Plant Cuticles - Fine-Structure and Cutin Composition of *Clivia-Miniata* Reg Leaves. *Planta* **174**, 127-138.
- Riederer M, Schreiber L.** 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2023-2032.

- Roelfsema MRG, Konrad KR, Marten H, Psaras GK, Hartung W, Hedrich R.** 2006. Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO<sub>2</sub> and abscisic acid. *Plant Cell and Environment* **29**, 1595-1605.
- Roeske CA, Oleary MH.** 1984. Carbon Isotope Effects on the Enzyme-Catalyzed Carboxylation of Ribulose Bisphosphate. *Biochemistry* **23**, 6275-6284.
- Sampol B, Bota J, Riera D, Medrano H, Flexas J.** 2003. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* **160**, 403-412.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R.** 2008. Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 683-707.
- Santrucek J, Vrablova M, Simkova M, Hronkova M, Drtinova M, Kveton J, Vrabl D, Kubasek J, Mackova J, Wiesnerova D, Neuwithova J, Schreiber L.** 2014. Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO<sub>2</sub> concentration. *Annals of Botany* **114**, 191-202.
- Serna L, Fenoll C.** 1997. Stomata pattern in Arabidopsis is modulated by ethylene. *Plant Physiology* **114**, 280-280.
- Serrano EE, Zeiger E, Hagiwara S.** 1988. Red-Light Stimulates an Electrogenic Proton Pump in Vicia Guard-Cell Protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 436-440.
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Metraux JP.** 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**
- Shepherd T, Griffiths DW.** 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* **171**, 469-499.
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T.** 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 219-247.
- Schirmer A, Rude MA, Li XZ, Popova E, del Cardayre SB.** 2010. Microbial Biosynthesis of Alkanes. *Science* **329**, 559-562.
- Schnurr J, Shockey J, Browse J.** 2004. The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 629-642.
- Schoch PG, Zinsou C, Sibi M.** 1980. Dependence of the Stomatal Index on Environmental-Factors during Stomatal Differentiation in Leaves of Vigna-Sinensis L .1. Effect of Light-Intensity. *Journal of Experimental Botany* **31**, 1211-1216.

- Schonherr J, Merida T.** 1981. Water Permeability of Plant Cuticular Membranes - the Effects of Humidity and Temperature on the Permeability of Non-Isolated Cuticles of Onion Bulb Scales. *Plant Cell and Environment* **4**, 349-354.
- Schreiber L, Riederer M.** 1996. Ecophysiology of cuticular transpiration: Comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. *Oecologia* **107**, 426-432.
- Tazoe Y, von Caemmerer S, Badger MR, Evans JR.** 2009. Light and CO<sub>2</sub> do not affect the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> diffusion in wheat leaves. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2291-2301.
- Tegelaar EW, Kerp H, Visscher H, Schenck PA, Deleeuw JW.** 1991. Bias of the Paleobotanical Record as a Consequence of Variations in the Chemical-Composition of Higher Vascular Plant Cuticles. *Paleobiology* **17**, 133-144.
- Terashima I.** 1992. Anatomy of Nonuniform Leaf Photosynthesis. *Photosynthesis Research* **31**, 195-212.
- Terashima I, Hanba YT, Tholen D, Niinemets U.** 2011. Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis. *Plant Physiology* **155**, 108-116.
- Terashima I, Ono K.** 2002. Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: Evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant and Cell Physiology* **43**, 70-78.
- Tholen D, Zhu XG.** 2011. The Mechanistic Basis of Internal Conductance: A Theoretical Analysis of Mesophyll Cell Photosynthesis and CO<sub>2</sub> Diffusion. *Plant Physiology* **156**, 90-105.
- Tomas M, Flexas J, Copolovici L, Galmes J, Hallik L, Medrano H, Ribas-Carbo M, Tosens T, Vislap V, Niinemets U.** 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2269-2281.
- Tosens T, Niinemets U, Vislap V, Eichelmann H, Diez PC.** 2012. Developmental changes in mesophyll diffusion conductance and photosynthetic capacity under different light and water availabilities in *Populus tremula*: how structure constrains function. *Plant Cell and Environment* **35**, 839-856.
- Tsuzuki M, Miyachi S, Edwards GE.** 1985. Localization of Carbonic-Anhydrase in Mesophyll-Cells of Terrestrial C-3 Plants in Relation to CO<sub>2</sub> Assimilation. *Plant and Cell Physiology* **26**, 881-891.

- Urey HC.** 1948. Oxygen Isotopes in Nature and in the Laboratory. *Science* **108**, 489-496.
- Vangarding PR, Jeffree CE, Grace J.** 1989. Variation in Stomatal Aperture in Leaves of *Avena-Fatua* L Observed by Low-Temperature Scanning Electron-Microscopy. *Plant Cell and Environment* **12**, 887-897.
- Vaten A, Bergmann DC.** 2012. Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view. *Evodevo* **3**
- Vioque J, Kolattukudy PE.** 1997. Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (*Pisum sativum* L). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **340**, 64-72.
- Vitousek PM, Field CB, Matson PA.** 1990. Variation in Foliar Delta-C-13 in Hawaiian *Metrosideros-Polymorpha* - a Case of Internal Resistance. *Oecologia* **84**, 362-370.
- Vrabl D, Vaskova M, Hronkova M, Flexas J, Santrucek J.** 2009. Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> transport estimated by two independent methods: effect of variable CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2315-2323.
- Warren CR.** 2008. Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO<sub>2</sub> transfer. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1475-1487.
- Willmer CM.** 1988. Stomatal Sensing of the Environment. *Biological Journal of the Linnean Society* **34**, 205-217.
- Wong SC, Cowan IR, Farquhar GD.** 1985a. Leaf Conductance in Relation to Rate of CO<sub>2</sub> Assimilation .1. Influence of Nitrogen Nutrition, Phosphorus-Nutrition, Photon Flux-Density, and Ambient Partial-Pressure of CO<sub>2</sub> during Ontogeny. *Plant Physiology* **78**, 821-825.
- Wong SC, Cowan IR, Farquhar GD.** 1985b. Leaf Conductance in Relation to Rate of CO<sub>2</sub> Assimilation .3. Influences of Water-Stress and Photoinhibition. *Plant Physiology* **78**, 830-834.
- Woodward FI.** 1987. Stomatal Numbers Are Sensitive to Increases in CO<sub>2</sub> from Preindustrial Levels. *Nature* **327**, 617-618.
- Xu XJ, Dietrich CR, Lessire R, Nikolau BJ, Schnable PS.** 2002. The endoplasmic reticulum-associated maize GL8 protein is a component of the acyl-coenzyme A elongase involved in the production of cuticular waxes. *Plant Physiology* **128**, 924-934.
- Yeats TH, Martin LBB, Viart HMF, Isaacson T, He YH, Zhao LX, Matas AJ, Buda GJ, Domozych DS, Clausen MH, Rose JKC.** 2012. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology* **8**, 609-611.



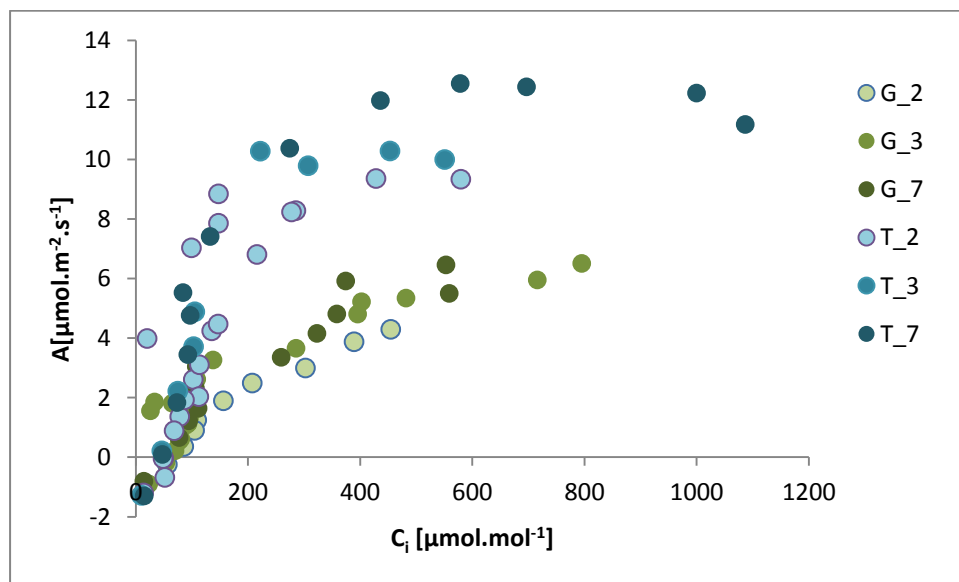
**Yeats TH, Rose JKC.** 2013. The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology* **163**, 5-20.

**Zeiger E, Talbott LD, Frechilla S, Srivastava A, Zhu JX.** 2002. The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. *New Phytologist* **153**, 415-424.

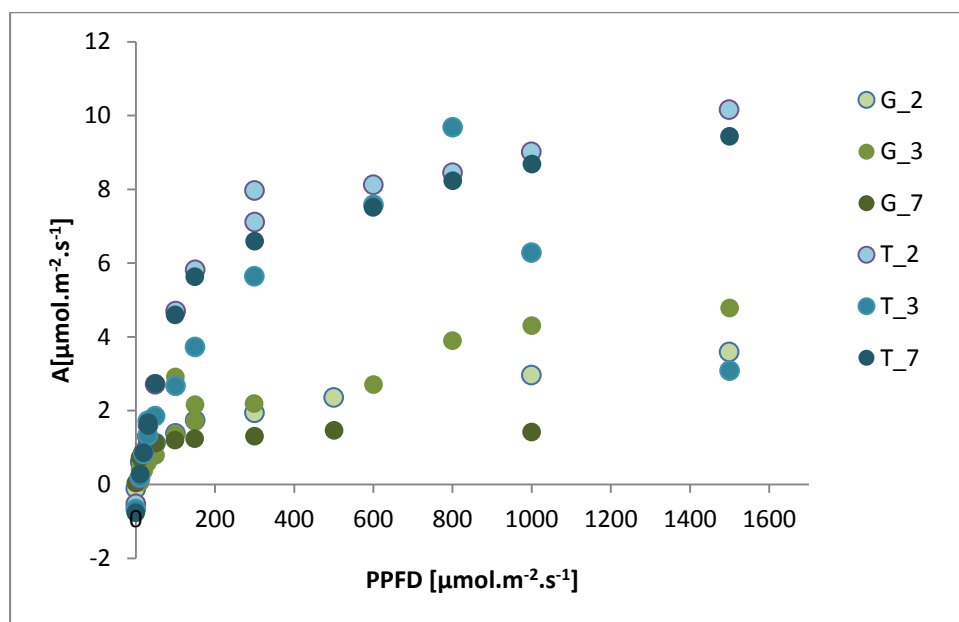
## 8. Přílohy

**Tab. P1:** Seznam rostlinných druhů použitých pro přehledovou studii, jejich zařazení do čeledi, obsah izotopu  $^{13}\text{C}$  stanovený v suché hmotě rozebratých listových terčů,  $\delta^{13}\text{C}$  [‰] a vnitřní koncentrace  $\text{CO}_2$  v době fotoperiody,  $C_i$ , integrovaná během růstu listu (rovnice 7,  $\delta_a = -8\text{‰}$ ,  $C_a = 410 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Latinský název	Čeleď	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	$C_i$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]
<i>Zamioculcas zamiifolia</i>	Araceae	-29,35	307,45
<i>Brachychiton populneum</i>	Malvaceae	-31,04	338,21
<i>Scindapsus aureus</i>	Monstereae	-29,17	304,16
<i>Ficus benjamina</i>	Moraceae	-28,64	294,66
<i>Ficus elastica</i>	Moraceae	-30,35	325,62
<i>Tradescantia spathaceae</i>	Commelinaceae	-33,79	388,05
<i>Ficus binnendijkii</i>	Moraceae	-29,74	314,48
<i>Passiflora edulis</i>	Passifloraceae	-29,82	316,08
<i>Ficus cyathistipula</i>	Moraceae	-29,79	315,55
<i>Scadoxus multiflorus</i>	Amaryllidaceae	-27,78	279,05
<i>Aglaonema commutatum</i>	Araceae	-35,38	416,89
<i>Schefflera arboricola</i>	Araliaceae	-28,92	299,75
<i>Euphorbia leuconeura</i>	Euphorbiaceae	-30,10	321,12
<i>Pandanus veitchii</i>	Pandanaceae	-31,64	348,95
<i>Hoya carnosa</i>	Apocynaceae	-20,77	151,79



**Obr. P1:** Závislost rychlosti asimilace  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) na koncentraci  $\text{CO}_2$  v podprůduchové dutině ( $C_i$ ) pro 2., 3. a 7. vzrostlý list rostliny *F. elastica*, varianty G (jedinec pěstovaný za nižší teploty a ozáření) a varianty T (jedinec pěstovaný při vyšší teplotě a ozáření). Listy varianty G byly měřeny při hustotě zářivého toku PPFD  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , listy varianty T byly měřeny při hustotě zářivého toku PPFD  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , v obou případech šlo o saturační ozáření ( $n = 1$ )



**Obr. P2:** Světelné křivky, tedy závislost  $A$  na hustotě dopadajících fotonů fotosynteticky aktivního záření (PPFD) pro 2., 3. a 7. vzrostlý list rostliny *F. elastica*, varianty G a varianty T. Měření probíhalo za stálé koncentrace  $\text{CO}_2$  u listu  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $n = 1$ ).

**Tab. P2:** Průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky měřených anatomických vlastností listů *F. elastica*, varianty G a T, měřeno u 2., 3. a 7. plně vzrostlého listu. Měřena byla tloušťka listu  $d$  [mm]; hmotnost sušiny na jednotku plochy listu,  $LMA$  [ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]; hustota průduchů,  $SD$  [ $\text{mm}^{-2}$ ] a průduchový index  $SI$  [%]; tloušťka kutikuly,  $d_c$  [ $\mu\text{m}$ ]. Dále je uveden obsah  $^{13}\text{C}$  v listu,  $\delta^{13}\text{C}_L$  [‰], stanovený v suché hmotě rozemletých listových terčíků a z něj vypočítaná vnitřní koncentrace  $\text{CO}_2$  v době foteriody, integrovaná během růstu listu,  $C_i$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ], počítaná ze vztahu č. 7 (viz Materiál a metody).

	Varianta G			Varianta T				
	2. list	3. list	7. list	2. list	3. list	7. list		
$d$ [mm]	0,611 $\pm$ 0,062	0,718 $\pm$ 0,035	0,606 $\pm$ 0,033	0,708 $\pm$ 0,086	0,723 $\pm$ 0,100	0,754 $\pm$ 0,126		
$LMA$ [ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	6,56 $\pm$ 0,17	7,53 $\pm$ 0,35	8,39 $\pm$ 0,28	13,23 $\pm$ 0,96	11,94 $\pm$ 1,35	13,84 $\pm$ 1,90		
$SD$ [ $\text{mm}^{-2}$ ]	54,1 $\pm$ 3,6	54,8 $\pm$ 4,4	53,0 $\pm$ 3,3	117,8 $\pm$ 6,3	116,3 $\pm$ 6,4	96,6 $\pm$ 4,2		
$SI$ [*100]	6,07 $\pm$ 1,47	5,59 $\pm$ 0,85	5,89 $\pm$ 0,71	7,45 $\pm$ 1,08	8,30 $\pm$ 1,14	5,89 $\pm$ 0,71		
$\delta^{13}\text{C}_L$ [‰]	-32,16 $\pm$ 0,27	-32,02 $\pm$ 0,18	-33,01 $\pm$ 0,11	-30,20 $\pm$ 0,26	-30,19 $\pm$ 0,17	-29,73 $\pm$ 0,17		
$C_i$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	358,4 $\pm$ 4,9	356,0 $\pm$ 3,2	374,0 $\pm$ 1,9	323,0 $\pm$ 4,8	322,8 $\pm$ 3,1	314,5 $\pm$ 3,1		
	2. list		5. list		2. list		5. list	
	adaxiální	abaxiální	adaxiální	abaxiální	adaxiální	abaxiální	adaxiální	abaxiální
$d_c$ [ $\mu\text{m}$ ]	3,26 $\pm$ 0,72	2,06 $\pm$ 0,45	3,26 $\pm$ 0,37	1,84 $\pm$ 0,39	5,83 $\pm$ 0,38	3,68 $\pm$ 0,56	4,11 $\pm$ 0,59	4,05 $\pm$ 0,42

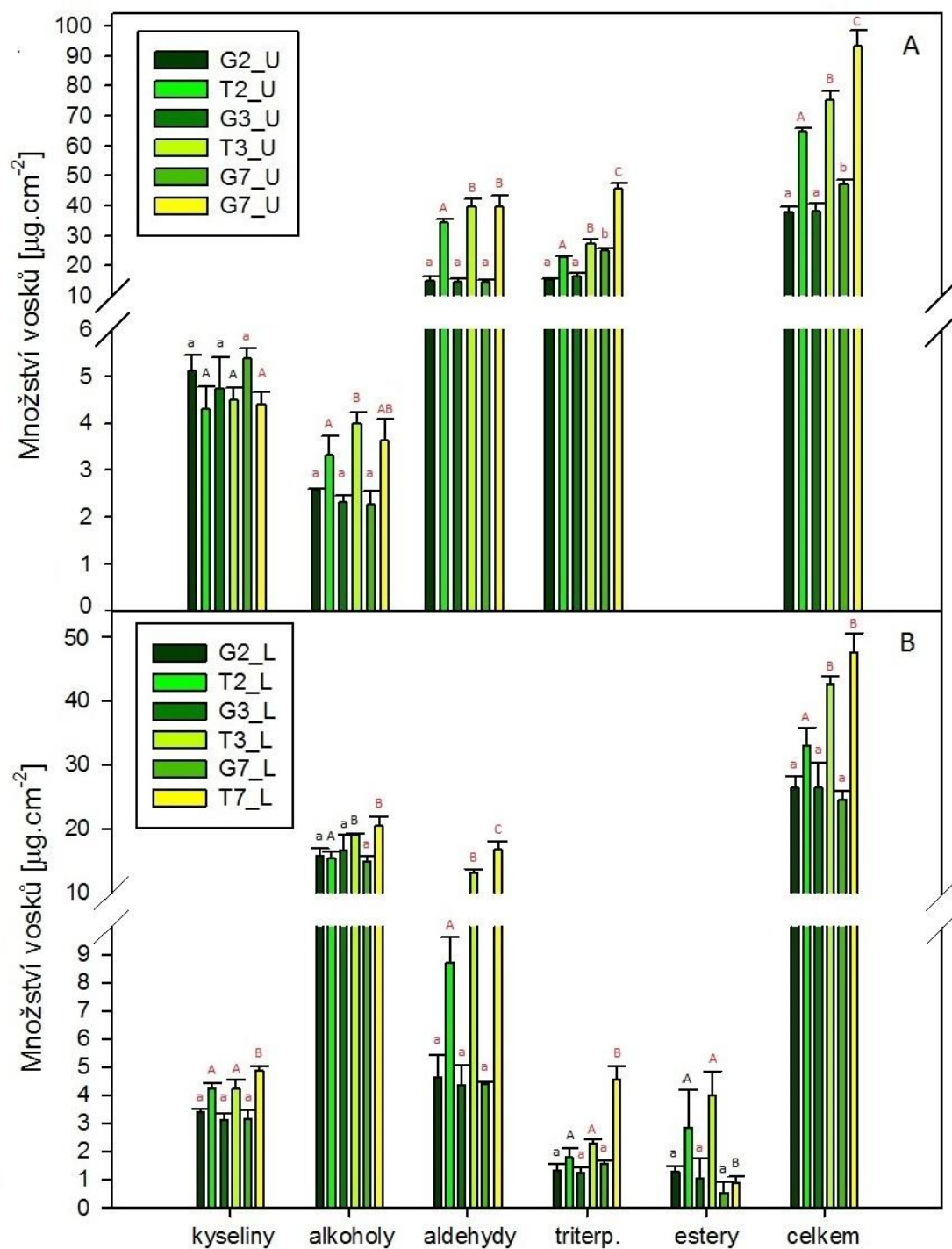
**Tab. P3:** Celkové množství kutikulárních vosků izolovaných z listů *F. elastica* pěstovaných v odlišných vnějších podmínkách (varianta G a varianta T). Pro každý list je uveden průměr ze 4 měření a směrodatná odchylka.

	Varianta G		Varianta T	
	adaxiální strana [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	abaxiální strana [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	adaxiální strana [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	abaxiální strana [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]
<b>2. list</b>	37,85±1,86	26,38±1,85	64,73±1,36	32,90±2,88
<b>3. list</b>	37,95±1,74	26,41±3,82	75,26±2,83	42,52±1,28
<b>7. list</b>	47,01±1,74	24,54±1,38	93,49±5,17	47,42±3,09

**Tab. P4:** Seznam látek identifikovaných pomocí GC-MS v kutikulárním vosku rostliny *F. elastica* pro variantu G (rostlina pěstovaná při nižší t a PAR) a variantu T (rostlina pěstovaná při vyšší t a PAR).

	Varianta G		Varianta T	
	adaxiální	abaxiální	adaxiální	abaxiální
<b>Kyseliny</b>	C <sub>16</sub> kyselina	C <sub>16</sub> kyselina	C <sub>16</sub> kyselina	C <sub>16</sub> kyselina
	C <sub>18</sub> kyselina	C <sub>18</sub> kyselina	C <sub>18</sub> kyselina	C <sub>18</sub> kyselina
	C <sub>20</sub> kyselina			C <sub>20</sub> kyselina
	C <sub>26</sub> kyselina			
	C <sub>28</sub> kyselina	C <sub>28</sub> kyselina	C <sub>28</sub> kyselina	
	C <sub>30</sub> kyselina	C <sub>30</sub> kyselina	C <sub>30</sub> kyselina	C <sub>30</sub> kyselina
	C <sub>32</sub> kyselina	C <sub>32</sub> kyselina	C <sub>32</sub> kyselina	C <sub>32</sub> kyselina
	C <sub>34</sub> kyselina		C <sub>34</sub> kyselina	C <sub>34</sub> kyselina
<b>Alkoholy</b>	C <sub>26</sub> alkohol	C <sub>26</sub> alkohol	C <sub>26</sub> alkohol	C <sub>26</sub> alkohol
	C <sub>28</sub> alkohol	C <sub>28</sub> alkohol	C <sub>28</sub> alkohol	C <sub>28</sub> alkohol
				C <sub>29</sub> alkohol
		C <sub>30</sub> alkohol		C <sub>30</sub> alkohol
	C <sub>31</sub> alkohol	C <sub>31</sub> alkohol	C <sub>31</sub> alkohol	C <sub>31</sub> alkohol
	C <sub>32</sub> alkohol	C <sub>32</sub> alkohol	C <sub>32</sub> alkohol	C <sub>32</sub> alkohol
	C <sub>33</sub> alkohol	C <sub>33</sub> alkohol	C <sub>33</sub> alkohol	C <sub>33</sub> alkohol
	C <sub>34</sub> alkohol	C <sub>34</sub> alkohol	C <sub>34</sub> alkohol	C <sub>34</sub> alkohol
<b>Aldehydy</b>		C <sub>25</sub> aldehyd		
			C <sub>28</sub> aldehyd	
	C <sub>30</sub> aldehyd	C <sub>30</sub> aldehyd	C <sub>30</sub> aldehyd	C <sub>30</sub> aldehyd
	C <sub>32</sub> aldehyd	C <sub>32</sub> aldehyd	C <sub>32</sub> aldehyd	C <sub>32</sub> aldehyd
	C <sub>33</sub> aldehyd		C <sub>33</sub> aldehyd	C <sub>33</sub> aldehyd
	C <sub>34</sub> aldehyd	C <sub>34</sub> aldehyd	C <sub>34</sub> aldehyd	C <sub>34</sub> aldehyd

<b>Triterpenoidy</b>		betulin	betulin	
	$\beta$ - amyryn	$\beta$ - amyryn	$\beta$ - Amyryn	$\beta$ - amyryn
		$\beta$ - sitosterol		$\beta$ - sitosterol
	$\alpha$ - amyryn	$\alpha$ - amyryn		$\alpha$ - amyryn
			triterpen	
<b>Estery</b>		Ester 1		Ester 1
		Ester 2		Ester 2
		Ester 3		Ester 3
<b>celkem</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>24</b>



**Obr. P3:** Absolutní množství extrahovaných vosků z adaxiální (A) a abaxiální (B) strany listu. Vosky jsou rozděleny podle funkčních skupin. Malými písmeny jsou označeny hodnoty pro listy z rostliny pěstované za nižší teploty a ozáření, varianty G; velkými písmeny hodnoty pro listy rostliny pěstované za vyšší teploty a ozáření, varianty T. Písmena zobrazují, zda jsou v rámci skupiny statisticky významné rozdíly (tedy mezi listy odlišného stáří); červená barva zobrazuje statisticky významný rozdíl mezi variantou T a G. Chybové úsečky zobrazují směrodatné odchylky (n=4).