Fyziologické metody sledování účinků stresu u rostlin.

dizertační práce

Jiří Janáček

Praha 1996

Poděkování
Za spolupráci na výzkumu fotosyntézy v nízké teplotě děkuji RNDr Mileně Vedralové a RNDr Iljovi Prášilovi, CSc. Za spolupráci a stálou diskusi při řešení problematiky suchovzdornosti děkuji ing. Jiřímu Zámečníkovi, CSc.. Za zadání tématu a poskytnutí dat pro metody hodnocení mrazového poškození děkuji RNDr Iljovi Prášilovi, CSc. Za návrh tématu a spolupráci při měření kořenů pšenice pomocí analýzy obrazu děkuji ing. Ladislavu Bláhovi, CSc. Paní Haně Ludvíkové děkuji za skvělou technickou pomoc zejména při kultivaci a manuálním měření rostlin. Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Lubomíru Nátrovi, DrSc za cenné připomínky během psaní této práce.
Výzkumy vztahu stresu nedostatkem vody a fotosyntézy rostlin byly částečně financovány z grantu GA ČR 501/93/0329.

Prohlášení
Práci jsem vypracoval pouze za pomoci literatury uvedené v seznamu na konci práce.
Uváděné výsledky, pokud není výslovně uvedeno něco jiného, jsou původní.

Obsah

1. Úvod 10
1.1 Rostlina, prostředí a stres 10
1.2 Hierarchie biologických struktur 10
1.3 Cíl práce 12
2. Gazometrické měření fotosyntézy během aklimace rostlin k nízké teplotě 14
2.1 Úvod 14
2.1.1 Fotosyntéza 14
2.1.2 Světelné reakce fotosyntézy 15
2.1.3 Biochemie fotosyntézy a vnitrobuněčný transport asimilátů 16
2.1.4 Fotosyntéza na úrovni asimilačního orgánu 22
2.1.5 Fotosyntéza na úrovni rostliny a porostu 25
2.1.6 Fotosyntéza C_3 rostlin v nízké teplotě 26
2.1.7 Cíl práce 26
2.2 Metoda 27
2.2.1 Metodika měření rychlosti asimilace a transpirace v otevřeném systému 27
2.2.2 Vyhodnocení výsledků měření v otevřeném gazometrickém systému 32
2.2.3 Kultivace rostlin 33
2.2.4 Popis experimentu 33
2.3 Výsledky 34
2.4 Diskuse 37
3. Působení stresu nedostatkem vody a koncentrace oxidu uhličitého na rostliny. 39
3.1 Úvod 39
3.1.1 Vodní potenciál a růst buňky 39
3.1.2 Transpirační proud a růst listu 39
3.1.3 Působení stresu nedostatkem vody na rostliny 40
3.1.4 Cíl práce 41
3.2 Metoda 42
3.2.1 Modelové funkce pro stomatální vodivost a rychlost čisté fotosyntézy 42
3.2.2 Stanovení podílu stomat a biochemických procesů na limitaci fotosyntézy. 42
3.2.3 Měření vodního potenciálu termočlánkovým hygrometrem. 44
3.2.4 Osmotický potenciál vodních roztoků PEG. 45
3.3 Výsledky 46
3.3.1 Dlouživý růst dvou kontrastních odrůd pšenice 46
3.3.2 Limitace fotosyntézy v řízených podmínkách 48
3.4 Diskuse 54
3.4.1 Vyvolání stresu pomocí PEG 54
3.4.2 Interakce stresu nedostatkem vody a koncentrace CO_2 54
4. Projevy stresu nedostatkem vody u genotypů ozimé pšenice 56
4.1 Úvod 56
4.1.1 Cíl práce 56
4.2 Metoda 56
4.2.1 Vyhodnocení výsledků získaných měřením v uzavřeném systému LI6000. 56
4.2.2 Kultivace 58
4.3 Výsledky 58
4.4 Diskuse 63
5. Hodnocení mrazového poškození rostlin pomocí nelineární regrese logistickou funkcí. 65

5.1 Úvod 65
5.2 Metoda 65
5.3 Výsledky 66
5.4 Diskuse 67
6. Třídění odrůd obilovin podle zimovzdornosti 68
6.1 Úvod 68
6.2 Metoda 68
6.3 Výsledky 70
6.4 Diskuse 71
7. Stanovení délky a charakterizace větvení kořenů 72
7.1 Úvod 72
7.2 Metoda 72
7.2.1 Počítačová analýza obrazu 72
7.2.2 Realizace metody 73
7.3 Výsledky 74
7.4 Diskuse 75
8. Závěr 76
9. Přílohy 77
9.1 Příloha A - zdrojová a příjmová funkce 77
9.2 Příloha B - zpracování údajů z uzavřeného systému LICOR 6000 na PC 77
9.2.1 vstupní data - příklad 77
9.2.2 jednotka pro práci s textovými řetězci 78
9.2.3 program KONVERT 79
9.2.4 výstupní data - formát 82
9.2.5 výstupní data - příklad 82
9.3 Příloha C - popis přiložené diskety 82
10. Citace 83

Seznam použitých zkratek a symbolů

Sloučeniny

PGA	3-fosfoglycerová kyselina
RuBP	ribulóza-1,5-bisfosfát
TP	triózofosfát, společný název pro dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehydfosfát
ATP	adenozintrifosfát
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát

Enzymy

PS I	fotosystém 1
PS II	fotosystém 2
WS	komplex rozkládající vodu
Q	akceptor elektronů z PS II
PQ	plastochinon
c_f	cytochrom f
PC	plastocyanin
Fd	feredoxin
Rubisco	ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza
PEP-karboxyláza	fosfoenolpyruvátkarboxyláza
P translokátor	fosfátovy translokátor na vnitřní obálce chloroplastu

Charakteristiky a parametry výměny plynů

P_N	rychlost čisté fotosyntézy
R_D	rychlost temnotního dýchání
R_L	rychlost fotorespirace
V_C	rychlost karboxylace RuBP
V_O	rychlost oxygenace RuBP
V_{OMAX}	rychlost oxygenace RuBP při saturaci Rubisca RuBP
V_{CMAX}	rychlost kaboxylace RuBP při saturaci Rubisca RuBP
K_O	Michaelisova konstanta Rubisca pro O_2
K_C	Michaelisova konstanta Rubisca pro CO_2
K_R’	Michaelisova konstanta Rubisca pro RuBP
Γ	kompenzační koncentrace CO_2
θ	podíl rychlostí oxygenace a karboxylace
τ	specificitní faktor Rubisco pro CO_2
O	koncentrace O_2
C	koncentrace CO_2
J_{ATP}	rychlost tvorby ATP
J_{NADPH}	rychlost tvorby NADPH
G	relativní zisk uhlíku v C_3 cyklu
J_R	rychlost spotřeby TP pro regeneraci RuBP
J_T	rychlost transportu TP z chloroplastu
E	rychlost transpirace
g_S^W	stomatální vodivost pro vodní páru
g_S^C	stomatální vodivost pro CO_2
c_L^C	koncentrace CO_2 v intercelulárách
p_L^W	parciální tlak H_2O v intercelulárách
t	teplota v °C
T	teplota v K
p_{atm}	atmosférický tlak
p^W_{sat}	tlak nasycené vodní páry

I	intenzita fotosynteticky aktivního záření
c^c	koncentrace CO_2 v atmosféře

Metabolizmus

C_3 cyklus	metabolická dráha fixace CO_2, redukce asimilátu a opětné regenerace akceptoru při fotosyntéze
C_2 cyklus	metabolická dráha regenerace PGA z fosfoglykolátu
C_3 fotosyntéza	typ fotosyntézy, při níž je Rubisco primárním akceptorem CO_2
C_4 fotosyntéza	typ fotosyntézy, při níž je primárním akceptorem CO_2 PEP-karboxyláza a primární a sekundární fixace je oddělena prostorově
CAM fotosyntéza	typ fotosyntézy, při níž je primárním akceptorem CO_2 PEP-karboxyláza a primární a sekundární fixace je oddělena časově

Fluorescence

F	zisk fluorescence
F_m	zisk fluorescence při saturačním záblesku před ozářením aktinickým světlem
F_m’	zisk fluorescence při saturačním záblesku při ozáření aktinickým světlem
F_0	zisk fluorescence před ozářením aktinickým světlem
F_0’	zisk fluorescence po ozáření aktinickým světlem
q_P	koeficient fotochemického zhášení fluorescence
q_N	koeficient nefotochemického zhášení fluorescence
m	maximální kvantový výtěžek světelných reakcí fotosyntézy

Zdrojová a příjmová funkce.

S(konc)	zdrojová funkce - rychlost produkce látky v závislosti na koncentraci
D(konc)	příjmová funkce - rychlost spotřeby látky v závislosti na koncentraci

Fyzikální konstanty

c	rychlost světla
λ	vlnová délka záření
N_A	Avogadrovo číslo
h	Planckova konstanta
k	Boltzmannova konstanta
R	univerzální plynová konstanta

Další gazometrické veličiny

p^W_O, p^W	parciální tlak vodní páry v okolí listu
p^W_I	parciální tlak vodní páry na vstupu do listové komory
c^C_O, c^C	koncentrace CO_2 v okolí listu
c^C_I	koncentrace CO_2 na vstupu do listové komory
f	průtok plynu listovou komorou
S	listová plocha
V^C	zdánlivý objem uzavřeného systému pro CO_2
V^W	zdánlivý objem uzavřeného systému pro vodní páru
t_c	časová konstanta výměny plynů v uzavřeném systému

Kritická teplota

CT_{50}	kritická teplota, při níž dojde k 50% poškození
I_{min}	minimální reakce na stres
I_{max}	maximální reakce na stres
RIR	relativní rychlost poškození

1 Úvod

Udržení každé formy života je závislé na přísunu energie a hmoty z prostředí. Příjem většiny energie a velké části hmoty do biosféry Země se děje v rostlinách v procesu fotosyntézy.

1.1 Rostlina, prostředí a stres

Prostředí živého organismu lze charakterizovat například dostupností energie, živin a informace nebo fyzikálními veličinami jako je teplota a tlak a je vytvářeno i interakcemi mezi různými formami života. Podmínky méně příznivé pro život nazýváme stresem. Stresový syndrom byl původně definován jako jednotná odpověď živočišného organismu na různé druhy zátěže (Selye, 1936), teprve později byla nazvána analogicky s mechanikou zátěž organismu nepříznivými podmínkami tlakem (stress) a vyvolaná reakce deformací (strain) (Levitt, 1980). Na rozdíl od mechaniky vyvolává stres v živých organismech i účelné (přestože nevědomé) procesy vedoucí k přizpůsobení nebo alespoň k otužení k nepříznivým podmínkám - aklimaci rostlinných organizmů a adaptaci rostlinných taxonů.

1.2 Hierarchie biologických struktur

Fyziologie se obecně zabývá procesy souvisejícími se životem na všech úrovních od molekuly po biosféru. Vědci odjakživa hierarchicky třídí objekty svého výzkumu. Příkladem je hierarchie objektů fotosyntetického výzkumu uvedená v tabulce (tabulka 1.2.a).

struktura	*proces*	*vědní obor, metoda*	*s nebo μm*
membrána	transport energie	fotochemie	10^{-5} -10^{-2}
ultrastruktura	elektron. transp.	biochemie	10^{-2} -10^{1}
metabolická hotovost	regulace metabolismu	gazometrie	10^{1} -10^{4}
výnosové prvky	kompartmentace	produkční biologie.	10^{4} -10^{7}
architektura porostu	dynamika vegetace	dálkový průzkum	10^{7} -10^{10}

Tabulka 1.2.A: Funkční hierarchie objektů výzkumu fotosyntézy. Čísla v pravém sloupečku udávají charakteristický rozměr struktury a relaxační čas, tedy dobu potřebnou k návratu do rovnováhy po působení rušivého vlivu (podle Osmonda a Chowa, 1988)

Jiným, klasickým, příkladem hierarchie je genetická hierarchie biologických struktur. Začíná u buněk mnohobuněčných organismů a přes organismy, klony a ekotypy pokračuje přes rostoucí taxonomické jednotky (viz tabulka 1.2.b), pro studium reakce rostlin na stres je významná pro sledování adaptací rostlinných taxonů k nepříznivým podmínkám.

forma	odrůda	druh	řada	sekce	rod	shluk		
forma	*varietas*	*species*	*series*	*sectio*	*genus*	*tribus*	>>	
		>>	čeleď	řád	třída	oddělení	kmen	říše
			familia	*ordo*	*classis*	*divisio*	*phylum*	*regnum*

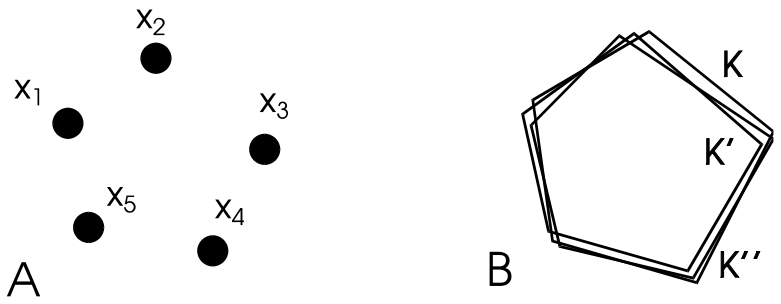
Tabulka 1.2.B: Hierarchie taxonomických jednotek v rostoucím pořadí (Novák, 1961).

Právě pro fyziologii je charakteristické, že kombinuje jevy na různých úrovních a využívá jak analytických tak syntetických metod výzkumu.

směr	objekt zájmu	definice	příklad
a) analytický	součásti systému	zdola	$\{x;\ x=\Sigma a_i x_i,\ \Sigma a_i=1\}$
b) syntetický	chování černé skříňky	shora	$\cap\{K;\ \{x_1,..,x_n\}\subseteq K,\ K$ konvexní$\}$

Tabulka 1.2.C: Vztah mezi syntetickou a analytickou metodou výzkumu se podobá vztahu mezi definicemi matematického objektu zdola a shora

Analytický a syntetický přístup k výzkumu lze přirovnat ke dvěma užívaným způsobům, definice matematických objektů, definice shora a zdola. Konvexní těleso generované body x_1, x_2, .. x_n, například, může být definováno buď zdola, jako množina všech konvexních kombinací bodů x_1, x_2, .. x_n, nebo shora, jako průnik všech konvexních množin, které x_1, x_2, .. x_n obsahují (tabulka 1.2.c, obrázek 1.2.a).
Definice shora a zdola jsou v dokonalém souladu, cílem fyziologických výzkumů je i zavést podobný soulad mezi dílčí poznatky o složkách systému (např. biochemické či molekulárně biologické) na jedné straně a poznatky o chování vyšších systémů (rostlin či ekosystémů na straně druhé). K poznání procesů souvisejících se životem může fyziolog využít výsledky snad každé vědní disciplíny, která se živými organismy zabývá, navíc používá specifické fyziologické metody.



Obrázek 1.2.A: Konvexní mnohoúhelník může být definován buď zdola pomocí vrcholů, anebo shora, jako průnik konvexních těles, které ho obsahují. Situace je analogická při zkoumání systému, který může být studován buď přes komponenty nebo pomocí sledování jeho chování.

1.3 Cíle práce

Tato práce je zaměřena zejména na sledování účinků stresu na rostliny a studium aklimace rostlin s využitím původních metod.
Prvním tématem je popis změn fotosyntetického aparátu rostlin pšenice během otužování k mrazu pomocí měření výměny plynů za teploty 5°C, případně posouzení souvislosti mezi změnami fotosyntetických charakteristik a mrazuvzdornosti v průběhu aklimace nebo u různých genotypů pšenice.
Druhým tématem je popis akutních účinků stresu nedostatkem vody v laboratorních podmínkách na fotosyntetickou asimilaci CO_2 u rostlin pšenice. Cílem je stanovit podíl stomatální a biochemické limitace na snížení rychlosti fotosyntézy vliven sucha a získat tak genotypové charakteristiky týkající se strategie hospodaření s vodou.
Dále jsou účinky sucha na výměnu plynů rostlinami různých genotypů pšenice sledovány i ve skleníkových podmínkách, kdy je nutné odstranit rušivý vliv proměnlivých vnějších podmínek na naměřené hodnoty rychlosti čisté fotosyntézy a stomatální limitace, aby se projevily rozdíly mezi genotypy.
Dalším, čtvrtým tématem je odvození a aplikace matematické metody na hodnocení mrazuvzdornosti rostlin z výsledků experimentů s řízeným mražením v laboratorních

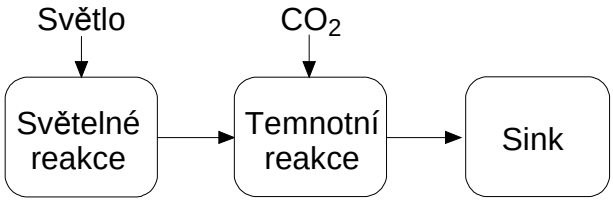
podmínkách. Metoda třídění odrůd podle zimovzdornosti na základě vyzimování je pátým tématem. Vývoj obou metod je zakončen jejich implementací v programech pro osobní počítač.
Posledním tématem je vytvoření metody pro stanovení délky kořenů pomocí počítačové analýzy obrazu a její použití pro sledování účinků nízkého pH a aluminiové toxicity na různě odolné kultivary ozimé pšenice.

2 Gazometrické měření fotosyntézy během aklimace rostlin k nízké teplotě

2.1 Úvod

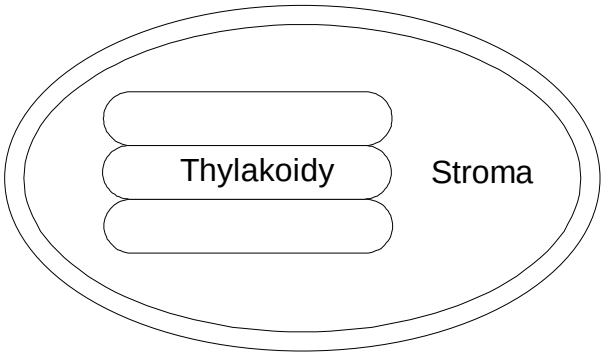
2.1.1 Fotosyntéza

Světlo je elektromagnetické záření v pásmu 400-700nm. Světelná energie je rostlinami zachycována ve světelných reakcích fotosyntézy, oxid uhličitý je asimilován a redukován v temnotních reakcích. Produkty fotosyntetické fixace CO_2, hlavně transportní cukry, jsou prodýchány nebo využity na stavbu rostlinných struktur.



Obrázek 2.1.1.A: Schéma transportu hmoty a energie při fotosyntéze. Sinkem jsou myšleny všechny procesy, které spotřebovávají produkty fotosyntetické asimilace CO_2.

Fotosyntéza probíhá v chloroplastech, buněčných organelách, které obsahují uzavřený membránový systém thylakoidů a jsou ohraničeny dvojitou obálkou (obrázek 2.1.1.b). Lumen thylakoidů zaujímá asi 1/8 objemu organely (Heldt a kol., 1973), zbytek je vyplněn stromatem.

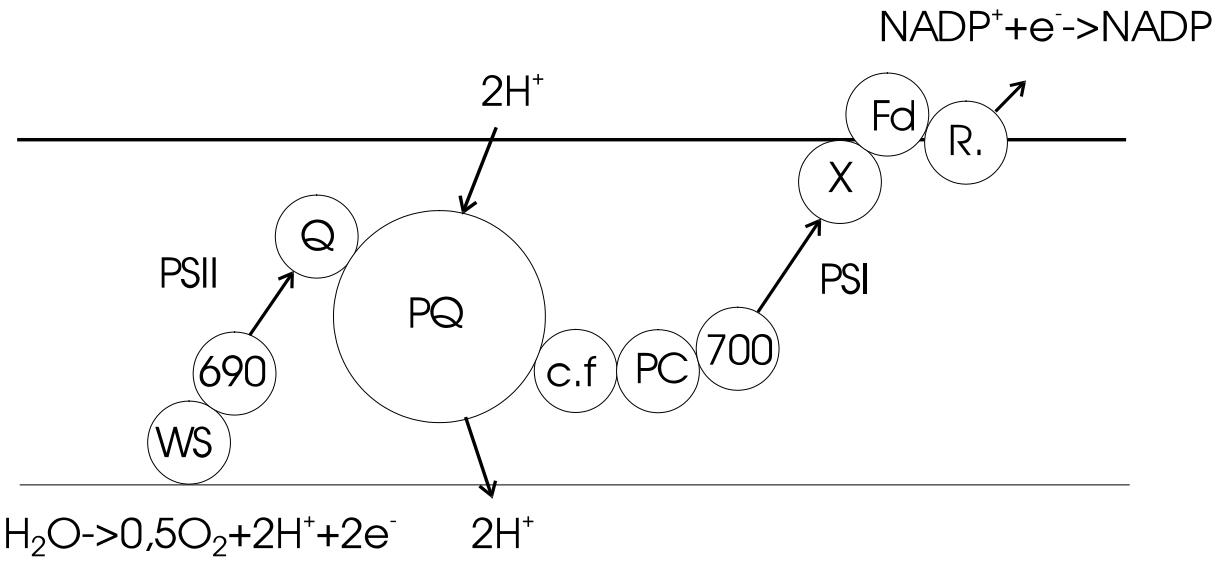


Obrázek 2.1.1.B: Schema chloroplastu - hlavními kompartmenty jsou thylakoidní lumen a stroma, vnější obálka chloroplastu je dobře propustná. Typický rozměr této organely jsou jednotky až desítky mikrometrů.

2.1.2 Světelné reakce fotosyntézy

Světlem vybuzené rozdělení náboje na fotosystémech PS uvádí do pohybu transport elektronů z vody (obrázek 2.1.2.a). Výsledkem světelných reakcí je energie uložená v redukčních ekvivalentech NADPH a v energii koncentračního gradientu protonů mezi thylakoidy a

stromatem, přeměňovaná ATPázou v thylakoidní membráně na formu bezprostředně využitelnou v metabolismu.

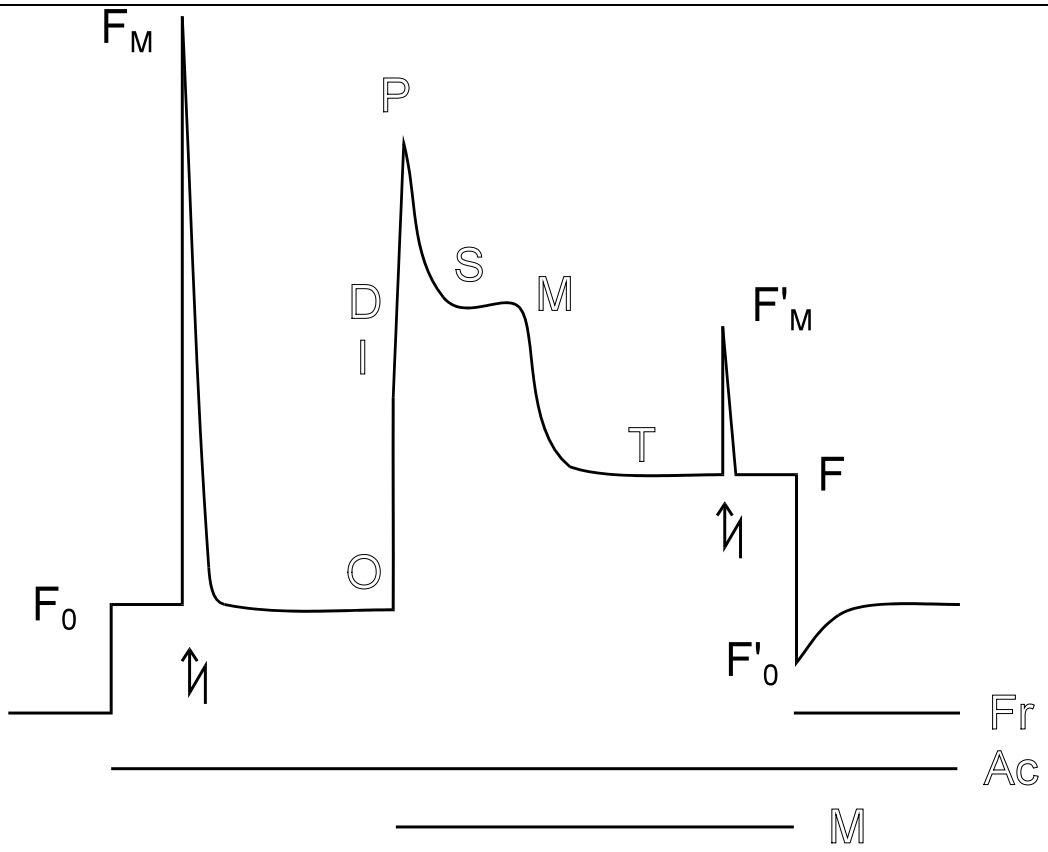


Obrázek 2.1.2.A: Elektron v thylakoidní membráně putuje z komplexu štěpícího vodu (WS), přes fotosystém II, (PSII), plastochinon (PQ) a fotosystém I (PSI) na ferredoxin (Fd) a NADP reduktázu (R). Část energie se přemění na chemický potenciál protonového gradientu.

Asi 1% z energie pohlcené PSII je vyzářeno ve formě fluorescenčního záření. Při fotosyntetické indukci vykazuje charakteristický průběh (obrázek 2.1.2.b). Moderní modulované fluorimetry umožňují měřit přímo podíl energie vyzářené při fluorescenci.

$$q_P = \frac{F'_M - F}{F'_M - F'_0} \qquad q_N = 1 - \frac{F'_M - F'_0}{F_M - F_0} \qquad (2.1.2.A)$$

Koeficient fotochemického (q_P) zhášení odpovídá redoxnímu stavu akceptoru elektronů Q. Koeficient nefotochemického zhášení (q_N), které se odvozuje z měření při Q redukovaném saturačními záblesky, odpovídá energizaci thylakoidní membrány (2.1.2.a), (Dietz a kol., 1985). Je z nich možno odhadnout rychlost toku elektronů (J) (2.1.2.b).



Obrázek 2.1.2.B: Křivka schematicky zobrazuje průběh zisku fluorescence při typickém experimentu s modulovaným fluorimetrem. Na ose y jsou relativní hodnoty naměřené modulovaným fluorimetrem. OIDPSMT je tradiční označení význačných bodů křivky Kautského jevu. Dole jsou vyznačeny časové intervaly, během nichž je zapnuto osvětlení měřící (M), aktinické (Ac) a tmavěčervené pro selektivní vybuzení PSI (Fr), blesky označují saturační záblesky.

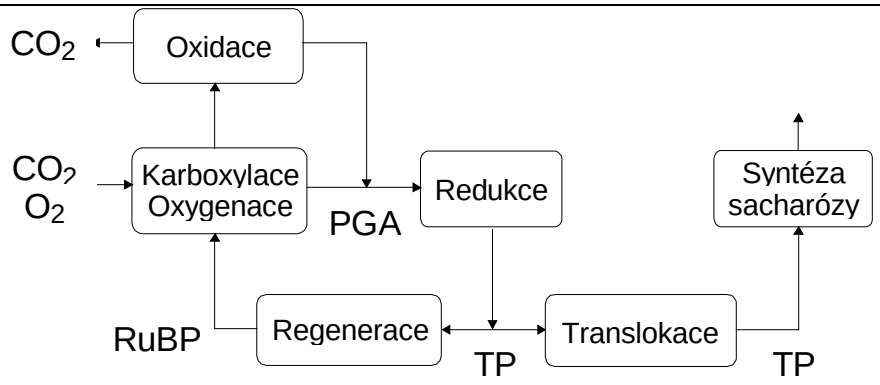
$$J = I \cdot q_P \cdot m \cdot (1 - q_N) = I \cdot q_P \cdot m \cdot \frac{F'_M - F'_0}{F_M - F_0} \qquad (2.1.2.B)$$

m=0.3 až 0.35 odpovídá maximálnímu kvantovému výtěžku. Snížení kvantového výtěžku je podle (2.1.2.b) doprovázeno snížením variabilní fluorescence (Schreiber a kol., 1994), jež je úměrné podílu uzavřených center PSII (Geacintov a Breton, 1987).

2.1.3 Biochemie fotosyntézy a vnitrobuněčný transport asimilátů

Primární fixace CO_2 v C_3 a sekundární fixace v C_4 a CAM rostlinách se děje v Calvinově cyklu. Čistá rychlost fotosyntézy P_N je sumou rychlosti karboxylace V_C, fotorespirace $R_L=0.5V_O$ a temnotního dýchání R_D s příslušnými znaménky. Pro rychlost toku uhlíku fotosyntetickými procesy (obrázek 2.1.3.a), A platí vztah (2.1.3.a).

$$A = P_N + R_D = V_C - 0.5 \cdot V_O \qquad (2.1.3.A)$$

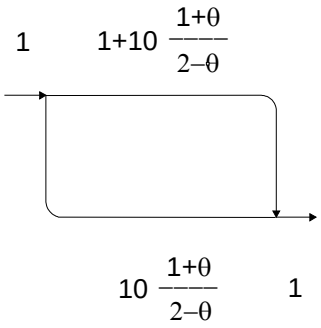


Obrázek 2.1.3.A: Schema toku uhlíku v temnotních reakcích C_3 fotosyntézy. C_3 cyklus v chloroplastech zahrnuje karboxylaci RuBP, redukci PGA a regeneraci RuBP. C_2 cyklus začíná oxygenací RuBP na fosfoglykolát a vede k regeneraci PGA, přitom se při konverzi glycinu na serin v mitochondriích uvolňuje CO_2.

Enzym Rubisco zprostředkovává karboxylaci a oxygenaci ribulózabisfosfátu. Vyskytuje se ve stromatu chloroplastu, funkční enzym je polymer L_8S_8 velkých (L) a malých (S) podjednotek, přičemž L jsou kódovány v chloroplastovém a S v jaderném genomu. Aktivace se děje vazbou iontu Mg^{2+} a atomu CO_2 v nekatalytickém místě za přispění enzymu Rubisco aktivázy a v některých rostlinných druzích je snižována specifickým inhibitorem carboxyarabinitol-1-fosfátem. Aktivita enzymu vykazuje denní průběh a závisí na prostředí (Kobza a Seeman, 1989). Celkový obsah enzymu lze uměle snižovat antisense supresí podjednotek S pomocí konstitutivního promotoru (Furbank a Taylor, 1995).
Za předpokladu dvojsubstrátové reakce s vazbou RuBP jako první a následně CO_2 nebo O_2, platí pro rychlost karboxylace V_C vzorec (2.1.3.b) (Farquhar, 1979).

$$V_C = V_{C\max} \cdot \frac{C/K_C}{1 + C/K_C + O/K_O} \cdot \frac{R/K'_R}{1 + R/K'_R} \qquad (2.1.3.B)$$

kde V_{Cmax} je rychlost karboxylace při saturaci substráty, C je koncentrace CO_2, O je koncentrace CO_2, K_C je Michaelisova konstanta pro CO_2, K_O je Michaelisova konstanta pro O_2, R je koncentrace RuBP, K'_R je efektivní Michaelisova konstanta pro RuBP.



Obrázek 2.1.3.B: Rychlosti reakcí v C_3 cyklu vyjádřené v látkových množstvích uhlíku vztažených na jednotkovou rychlost fixace. Rychlost příjmu je rozdíl rychlosti fixace CO_2 a rychlosti jeho výdeje při fotorespiraci. Předpokládá se, že spotřeba metabolitů jinými metabolickými cestami než je tvorba sacharózy (tvorba škrobu, tvorba aromatických sloučenin šikimátovou cestu) je zanedbatelná a tedy se rychlost příjmu uhlíku rovná rychlosti výstupu uhlíku v redukovaných tříuhlíkatých fosforylovaných cukrech. Dále se předpokládá, že se ve fotorespiračním C_2 cyklu regeneruje právě čtvrtina uhlíku.

Pro podíl rychlostí karboxylace a oxygenace θ platí (2.1.3.c).

$$\theta = \frac{V_O}{V_C} = \frac{V_{O\max}}{V_{C\max}} \cdot \frac{O/K_O}{C/K_C} = 1/\tau \cdot O/C \qquad (2.1.3.C)$$

τ se nazývá koeficient specificity. Podíl θ při dané koncentraci C lze spočítat z fotokompenzační koncentrace CO_2 (Γ), při níž je rychlost asimilace rovna rychlosti fotorespirace (2.1.3.d).

$$\theta = \frac{2 \cdot \Gamma}{C} \qquad (2.1.3.D)$$

Experimentálně byla stanovena závislost fotokompenzační koncentrace na teplotě u špenátu (2.1.3.e)(Brooks a Farquhar, 1985).

$$\Gamma = 42.7 + 1.68 \cdot (t - 25) + 0.0012 \cdot (t - 25)^2 \qquad (2.1.3.E)$$

V ustáleném stavu platí pro toky uhlíku v C_3 cyklu stechiometrie daná zejména poměrem oxygenace a karboxylace RuBP (θ) viz obrázek 2.1.3.b.
Ze stechiometrie Calvinova C_3 cyklu a fotorespiračního C_2 cyklu lze odvodit požadavky na spotřebu ATP při redukci a regeneraci substrátu v C_3 cyklu a fosforylaci glycerátu v C_2 cyklu a spotřebu NADPH při redukci v C_3 cyklu a při refixaci NH_3 v C_2 cyklu (Farquhar a kol., 1980) a odtud lze odvodit rychlosti spotřeby ATP a NADPH uvedené v rovnicích (2.1.3.f) a (2.1.3.g).

$$J_{ATP} = \frac{6 + 7 \cdot \theta}{2 - \theta} \cdot A \qquad (2.1.3.F)$$

$$J_{NADPH} = \frac{4 + 4 \cdot \theta}{2 - \theta} \cdot A \qquad (2.1.3.G)$$

Předpokládáme li že je ATP limitující, že vzniká 1.33 ATP na elektronový pár a dosadíme li za θ z rovnice (2.1.3.d), dostáváme pro rychlost fotosyntézy limitované regenerací RuBP v závislosti na rychlosti elektronového toku J:

$$A \le \frac{J \cdot (C - \Gamma)}{4.5 \cdot C + 10.5 \cdot \Gamma} \qquad (2.1.3.H)$$

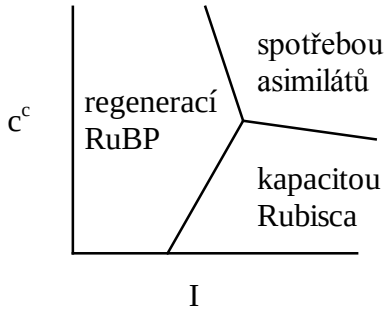
Rychlost asimilace limitovaná kapacitou enzymu Rubisco se odvodí z formule (2.1.3.b) a stechiometrie C_3 cyklu.

$$A \le V_{C\max} \cdot \frac{(C - \Gamma)/K_C}{1 + C/K_C + O/K_O} \qquad (2.1.3.I)$$

Konečně může být fotosyntetická asimilace limitována spotřebou produktu a tedy platí (Sharkey, 1985):

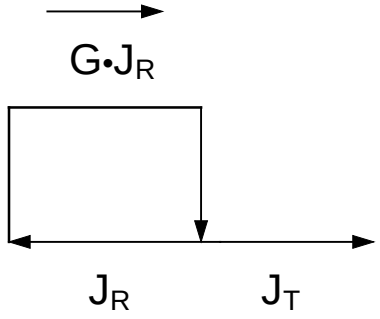
$$A \le A_{\max} \qquad (2.1.3.J)$$

Rychlost čisté fotosyntézy v závislosti na vnějších podmínkách lze modelovat vycházeje z předpokladu, že je v obecné kombinaci podmínek limitující právě jedna z komponent fotosyntetického aparátu (elektronový transport, fixace CO_2 a metabolismus sacharidů), (obrázek 2.1.3.c) a ostatní komponenty jsou regulovány tak, aby nastala rovnováha (Sage, 1990). Prakticky se při výpočtu rychlosti asimilace postupuje tak, že se stanoví hodnoty (2.1.3.h), (2.1.3.i) a (2.1.3.j) a vezme se nejmenší z nich.



Obrázek 2.1.3.C: Typy limitace fotosyntetického metabolismu v závislosti na světle (I) a koncentraci oxidu uhličitého (c^c). Limitace kapacitou Rubisca nastává pouze při silném světle. Limitace fotosyntézy spotřebou asimilátů nastává při kombinaci vysokého světla a vysoké koncentrace CO_2 a je podporována nízkou teplotou (volně podle Sage, 1990).

Calvinův cyklus je autokatylitický - akceptor CO_2 se získává regenerací produktů. To se projevuje například při indukci fotosyntézy po ozáření, kdy část akceptoru CO_2 musí být nejprve získána asimilací.
Rovnováha mezi tokem uhlíku do regeneračních reakcí a translokací je uskutečněna nelineární zpětnou vazbou, která při nízkých koncentracích produktu preferuje autokatalýzu a při vyšších koncentracích transport (obrázek 2.1.3.d). Její zisk (G) je určen stechiometrií Calvinova cyklu, závislou především na poměru karboxylace a oxygenace RuBP.



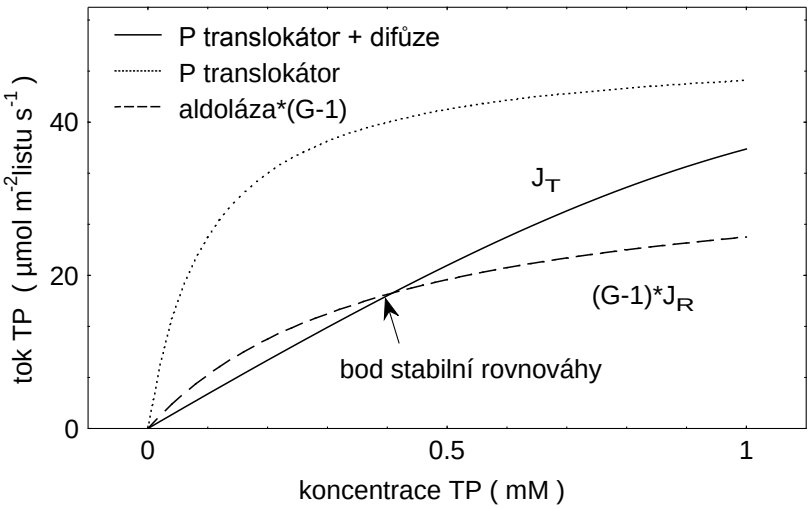
Obrázek 2.1.3.D : Triózafosfáty (TP)(dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehydfosfát) jsou jednak transportovány z chloroplastu rychlostí J_T, a jednak jsou spotřebovávány rychlostí J_R na regeneraci RuBP. Označíme rychlost produkce TP jako $G*J_R$, kde G je zisk zpětné vazby, závislý na stechiometrii Calvinova cyklu.

Pro výpočet kinetiky translokace asimilátů přes obálky chloroplastu používám Mentenovskou kinetiku spřaženou s difúzním transportem. Musí-li substrát nejprve překonat určitý difúzní odpor R, platí pro rychlost reakce a transportu V

$$V = \frac{V_{max} \cdot c'}{K_m + c'} \qquad V = \frac{c - c'}{R} \qquad (2.1.3.K)$$

kde c vnější a c' vnitřní koncentrace substrátu, V_{max} a K_m konstanty reakce. Rychlost reakce v závislosti na vnější koncentraci substrátu vyjde po vyřešení soustavy rovnic (2.1.3.k) takto:

$$V = V_{max} \cdot \left(0.5 \cdot \left(1 + \frac{K_m + c}{R \cdot V_{max}} \right) - \sqrt{0.25 \cdot \left(1 + \frac{K_m + c}{R \cdot V_{max}} \right)^2 - \frac{c}{R \cdot V_{max}}} \right) \qquad (2.1.3.L)$$



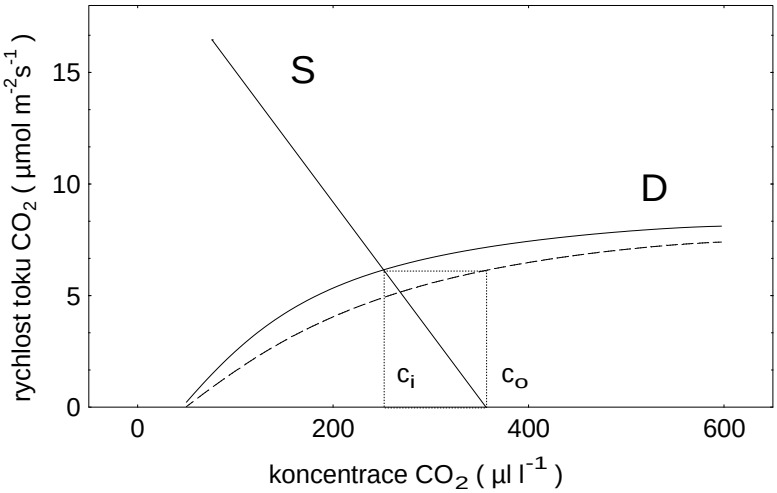
Obrázek 2.1.3.E: Rovnováha mezi rychlostí regenerace RuBP (J_R) a transportem asimilátů z chloroplastu (J_T) je udržována nelineární zpětnou vazbou. Závislost rychlosti translokace na koncentraci asimilátů (TP) je vypočtena pomocí (2.1.3.l), s Michaelisovou konstantou pro P translokátor rovnou 0.1 mM (Heldt a kol., 1990, Flugge, 1986) a difúzní dráhou z místa redukce PGA na TP dlouhou 0.1 µm. Funkce tvorby asimilátů ($(G-1)*J_R$) v závislosti na koncentraci TP je dopočítána z Michaelisovy konstanty pro aldolázu rovné 0.4 mM (Edwards a Walker, 1983) a typické koncentrace TP rovné 0.4 mM. Ustálený stav nastává při rovnosti příjmové funkce J_T a zdrojové funkce $(G-1)*J_R$.

Protože tok uhlíku je dán výsledkem rovnováhy mezi zdrojovou funkcí tvorby asimilátů $(G-1)*J_R$ a funkcí spotřeby J_T (obrázek 2.1.3.e), může spotřeba asimilátů prostřednictvím P translokátoru přímo ovlivňovat rychlost regenerace RuBP a tedy i rychlost fotosyntézy. Porušení rovnováhy mezi příjmem a výdejem uhlíkatých koster v chloroplastu by mohlo snadno vést k hromadění fosforylovaných sloučenin a k vyčerpání volného anorganického fosfátu, nutného pro syntézu ATP. To může být příčina některých poruch ve fotosyntetickém metabolismu v podmínkách O_2 insenzitivní fotosyntézy (Viil a kol, 1977) i toho, že mutace v chloroplastové aldoláze jsou vždy letální (U. Sonnewald, osobní sdělení).

Výše uvedený jednoduchý model rychlosti fotosyntézy, založený na stechiometrii C_3 cyklu, přestává platit, pokud jsou porušeny jeho předpoklady, uvedené v popisu obrázku (obrázek 2.1.3.b). Část asimilátů může z bloku regenerace odcházet do šikimátové cesty (ve formé erytróza-4-fosfátu, dle Geiger a Servaites, 1994), část může být skladována v škrobu. Zdá se také, že C_2 cyklus regenerace PGA z fosfoglykolátu nemusí být zcela uzavřen (Harley a Sharkey, 1991). Možná je částečně metabolizována i neredukovaná forma asimilátů (PGA), zvláště při limitaci spotřebou asimilátů, projevující se jako O_2 insenzitivita (Viil a kol., 1977, Laisk a Sumberg, 1994). Tyto a další jevy mohou při nekritickém použití modelů fotosyntézy založených na stechiometrii vést např. k tomu, že odhady specificity Rubisco z rychlosti výměny plynů jsou v rozporu s měřeními *in vitro* (Lehnherr a kol., 1985, Ghashghaie a Cornic, 1994).

2.1.4 Fotosyntéza na úrovni asimilačního orgánu

Obvyklý plochý tvar listu je výhodný, protože je k zachycování určitého světla potřeba méně strukturního materiálu a difúzní dráha CO_2 z vnějšího prostředí k fotosyntetizujícím buňkám je kratší než u jiných tvarů. Na rozhraní listu a prostředí je epidermis s pasivními a aktivními prvky regulujícími příjem CO_2, ztrátu vody i absorbci světla. Zásobenost vodou a minerálními látkami a odvod asimilátů zajišťují svazky cévní. Zbytek listu vyplňuje a hlavní funkce plní mezofyl tvořený parenchymem s výraznými intercelulárními prostory. Palisádový charakter mezofylu preferuje absorbci světla, zejména pokud přichází z jednoho směru (Vogelmann a Martin, 1993). Pro difúzi CO_2 listem v plynné fázi je výhodný amfistomatální list a houbový parenchym, což se odráží v menším vlivu difůze na rychlost fotosyntézy (Parkhurst a Mott, 1990).
Při aklimaci k nedostatku vody listy nabývají xeromorfního charakteru, pro nějž je typická redukce plochy povrchu k objemu a zvýšená hustota průduchů i vodivých pletiv (Fahn, 1990). Z funkčního hlediska významné kvantitativní charakteristiky listu, jako jsou objemové podíly jednotlivých pletiv, objemová hustoty plochy rozhraní mezofylu a intercelulár případně plošná hustota délky vodivých pletiv mohou být stanoveny stereologickými metodami (Parkhurst, 1982, Kubínová, 1993, Nátr a Pazourek, 1986).
Hlavní difúzní odpor v asimilační dráze CO_2 představují stomata. Vodivost mezofylu je asi 1.4 větší než vodivost plně otevřených stomat a je mezi druhy pozitivně korelována s fotosyntetickou kapacitou (Loreto a kol., 1992). Je známo, že stomata přímo reagují zavíráním na zvýšení intercelulární koncentrace CO_2 (Mott, 1988), působení ABA nebo na zvýšení rychlosti transpirace (Mott a Parkhurst, 1991), a otevíráním na modré a červené světlo (Kearns a Assmann, 1993). Vodivost stomat klesá při senescenci listu (Čatský a kol., 1985) a při stresu nedostatkem vody.
Zanedbáme li prostorové nehomogenity ve stomatální vodivosti a v koncentraci CO_2 uvnitř listu, a interakci CO_2 s transpirací, je difúzní tok CO_2 úměrný spádu koncentrace mezi



Obrázek 2.1.4.A: Ustálená rychlost čisté fotosyntézy je výsledkem interakce procesů v mezofylu a difúzní vodivosti stomat. Mezofyl lze charakterizovat závislostí rychlosti čisté fotosyntézy na intercelulární koncentraci CO_2 - příjmovou funkcí koncentrace D. Zdrojová funkce S závislá na koncentraci má směrnici rovnou převrácené hodnotě stomatální vodivosti (Farquhar a Sharkey, 1982) .

vnějškem a vnitřkem listu (c_O^C-c_L^C) (obrázek 2.1.4.a). Je li koncentrace vyjádřena molárním zlomkem, má g_S^C, stomatální vodivost pro CO_2, stejný rozměr jako rychlost výměny CO_2,.

$$P_N = g_S^C\left(c_O^C - c_L^C\right) \qquad (2.1.4.A)$$

Stomatální vodivost pro vodní páru, g_S^W, je přibližně rovna stomatální vodivosti pro CO_2, g_S^C, násobené empirickým koeficientem 1.6, odpovídajícím poměru difúzních koeficientů pro H_2O a CO_2 ve vzduchu.

$$g_S^W = 1.6 \cdot g_S^C \qquad (2.1.4.B)$$

Chceme li aby stomatální vodivost co nejlépe odpovídala apertuře stomat a byla co nejméně závislá na experimentálních podmínkách, jako je teplota či tlak, vyjádřujeme gradient koncentrace vodní páry jako gradient parciálního tlaku $\Delta p/p_{atm}$ (Mc Dermitt, 1990). Rychlost transpirace E pak splňuje rovnici:

$$E = g_S^W \frac{\Delta p}{p_{atm}} \qquad (2.1.4.C)$$

Stomatální vodivost pro H_2O kombinovanou s vodivostí hraniční vypočteme z rychlosti transpirace, změřené hodnoty parciálního tlaku vodní páry v okolí listu a parciálního tlaku nasycené páry uvnitř listu spočteného z teploty listu (což lze například pomocí Antoineovy formule (2.2.2.b)).
Pokud uvážíme interakci CO_2 s vodní parou vychází teoretická intercelulární koncentrace CO_2 za běžných podmínek o 5-10 µmol mol^{-1} menší (Sharkey, 1985). Příslušná formule zahrnující rychlost transpirace E je

$$P_N = \left(g_s^c - E/2\right)\cdot c_o^c - \left(g_s^c + E/2\right)\cdot c_L^c \qquad (2.1.4.D)$$

kde c_O^C je koncentrace CO_2 v okolí listu a c_L^C je koncentrace CO_2 v intercelulárách.

Apertura stomat je i v rámci jednoho listu velmi variabilní (Laisk, 1983). Vlivem sucha nebo ABA dochází zejména u heterobarických listů k prostorově různorodému zavírání průduchů (Sharkey a Seemann, 1988). Přímé použití formule (2.1.4.a) nebo (2.1.4.d) vede v takových případech k nadhodnocení hodnoty koncentrace CO_2 uvnitř listu a následně k chybnému závěru o limitaci fotosyntézy temnotními reakcemi fotosyntézy (van Kraalingen, 1990). Ukazuje se však, že jednak heterogenní zavírání průduchů vlivem sucha není obecný jev a u trav nenastává (Gunasekera a Berkowitz, 1992), jednak měření s přímým stanovením koncentrace CO_2 v listu ukazují, že limitace fotosyntézy metabolismem při suchu nemusí být vždy artefakt způsobený prostorově různorodým zavíráním průduchů (Lauer a Boyer, 1992). Budeme nadále předpokládat, že v našich experimentech prostorově nehomogenní zavírání průduchů nenastává.

2.1.5 Fotosyntéza na úrovni rostliny a porostu

Výměna tepla a hmoty mezi rostlinou a okolím se děje zejména nucenou konvekcí, poháněnou větrem, nebo volnou konvekcí, při níž je zdrojem pohybu vztlak vyvolaný ohřevem. Protože konkrétní fyzikální situaci je těžko přesně definovat a řešení rovnic řídících transport je komplikované, používá se pro zjednodušený popis situace bezrozměrných charakteristických čísel (Schuepp, 1993), což jsou invarianty fyzikálně podobných systémů, tedy systémů, které jsou si geometricky podobné a liší se fyzikálními vlastnostmi látek a působícími silami tak, že se vyvíjejí stejně, jen se změnou časového a prostorového měřítka. Odpor hraniční vrstvy listu pro výměnu plynů v konkrétní situaci se stanovuje například pomocí jednostranného modelu listu, zhotoveného z provlhčeného filtračního papíru (Gaastra, 1959). Atmosféra na povrchu umělého listu je nasycena vodní parou, z teploty listu lze tedy spočítat parciální tlak. Poměr vodivosti hraniční vrstvy pro H_2O a CO_2 je v případě laminární hraniční vrstvy, kdy hraje roli kromě difúze i proudění, $1.37 \sim (1.6)^{2/3}$ (Laisk, 1977) (mocnitel 2/3 vyplývá z fyzikálního popisu laminárního prouděná v hraniční vrstvě) při turbulentním míchání jsou vodivosti stejné.
Pokud je odpor hraniční vrstvy velký, má stomatální regulace na rychlost transpirace jen malý vliv. To se projeví v hodnotě tzv. koeficientu odpřažení (McNaughton a Jarvis, 1991) (2.1.5.a) blízké k 1. Hodnoty Ω vyjadřují ztrátu kontroly stomat nad transpirací a pohybují se od 0.01 pro jehličnany ve větru až po 0.97 pro velké listy tropických rostlin (Schuepp, 1993).

$$\Omega = 1 - \frac{g_s}{E} \cdot \frac{dE}{dg_s} \qquad (2.1.5.A)$$

Asimiláty jsou dopravovány na místa spotřeby floémem, hnací silou pro tok floému je pravděpodobně pouze gradient hydrostatického tlaku (Minchin a Thorpe, 1987), vyvolaný aktivním transportem asimilátů do floému (Magnusson a kol., 1986). Způsob rozdělování asimilátů je řízen „přitažlivou silou“ místa spotřeby. Vhodnými modelovými sinky jsou rostlinní parazité, rostoucí semena luskovin nebo obilky, plody, nektarie a hlavně mladé rostoucí orgány (Wolswinkel, 1985). Snížení spotřeby a následné hromadění asimilátů může vyvolat snížení rychlosti fotosyntézy (Williams a Farrar, 1988). Protože i rostoucí fotoautotrofní orgány jsou sinkem pro asimiláty, je fotosyntetická produkce autokatalytický proces a to se projeví v počáteční exponenciální fázi růstu rostliny, jehož charakteristika, relativní rychlost růstu, závisí na způsobu rozdělování asimilátů mezi autotrofní a heterotrofní orgány stejně jako na rychlosti fotosyntézy.

2.1.6 Fotosyntéza C_3 rostlin v nízké teplotě

Nízká teplota nad 0°C vyvolává u rostlin mírného klimatu odolných k chladu aklimaci k nízké teplotě a otužování k působení mrazu. Rychlost růstu a temnotního dýchání rostlin jsou při nízké teplotě sníženy více než rychlost fotosyntézy (Levitt, 1980). Snížená spotřeba, případně zpomalený transport, asimilátů vede k jejich hromadění a k limitaci fotosyntézy sinkem (obrázek 2.1.3.c), projevující se ztrátou citlivosti rychlosti čisté fotosyntézy ke snížení koncentrace kyslíku nebo ke zvýšení koncentrace CO_2 (Joliffe a Treguna, 1968). Protože energie zachycená světelnými reakcemi nemůže být plně využita v temnotních reakcích, vzniká velký gradient protonů přes thylakoidní membránu, projevující se vysokou hodnotou koeficientu nefotochemického zhášení (Labate a kol., 1989), a dochází snadno k fotoinhibici. Během aklimace v nízké teplotě se kyslíková citlivost fotosyntézy obnovuje (Huner a kol., 1986, Sage a Sharkey, 1987). Dalším projevem aklimace je snížení citlivosti k fotoinhibici, které mezi genotypy obilovin dobře koreluje s nárůstem fotosyntetické kapacity, což potvrzuje výše uvedený mechanismus vzniku fotoinhibice v nízké teplotě, a také se získanou odolností rostlin, což svědčí o velkém významu aklimace fotosyntézy pro otužování rostlin (Öquist a kol., 1993, Öquist a Huner, 1993). Dá se říci, že u zimovzdorných bylin je cílem aklimace fotosyntetického aparátu udržet i v zimě vysokou rychlost fotosyntézy potřebnou pro otužení na rozdíl od jehličnanů, u nichž dochází k regulovanému snížení účinnosti světelných reakcí fotosyntézy tak, aby byl fotosyntetický aparát chráněn před fotodestrukcí (Huner a kol., 1993).

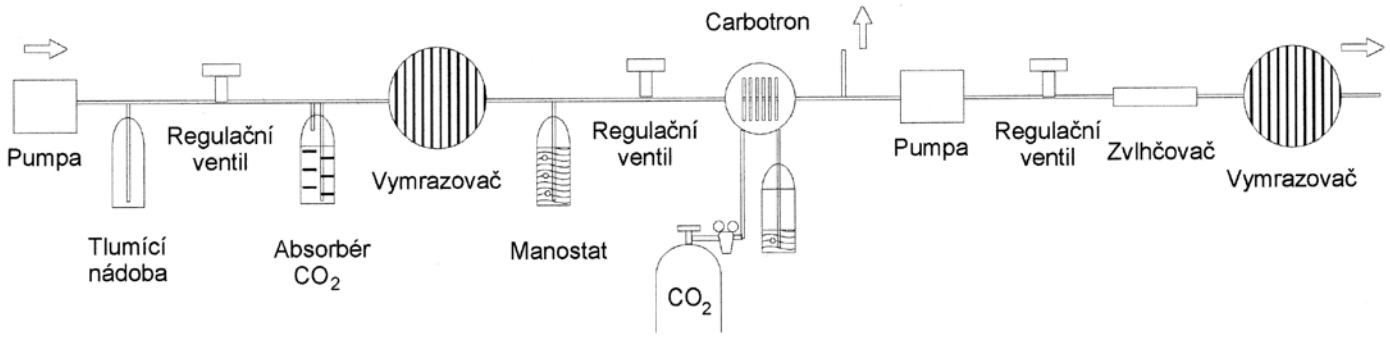
2.1.7 Cíl práce

Většina prací uvedených v kapitole 0, týkajících se fotosyntézy a otužování, se zabývá změnami po dlouhodobém otužování popřípadě po vývinu listu, který proběhl zcela v nízké teplotě. Protože je známo, že i plně vyvinuté listy ozimých obilovin jsou schopné výrazného otužení, a toto otužení je patrné už za dobu jednoho týdne, zajímalo nás, zda je toto otužení doprovázeno změnami ve fotosyntetickém aparátu, projevujícími se ve výměně plynů. Hlavním objektem zájmu byly změny v typu fotosyntetické limitace (obrázek 2.1.3.c) sledované pomocí změn v citlivosti čisté fotosyntézy ke snížení koncentrace kyslíku nebo ke zvýšení koncentrace CO_2 a v rychlosti indukce fotosyntézy po osvětlení. Limitace spotřebou asimilátů se může projevit i v indukci fotosyntézy světlem, protože indukce vyžaduje nahromadění metabolitů Calvinova cyklu a limitace sinkem může vést k rychlému hromadění metabolitů C_3 cyklu a tím i k rychlejší indukci. Zajímal nás i časový průběh změn během aklimace. Perspektivním cílem těchto a podobných výzkumů je získat fyziologický marker odolnosti rostlin ozimé pšenice k mrazu.

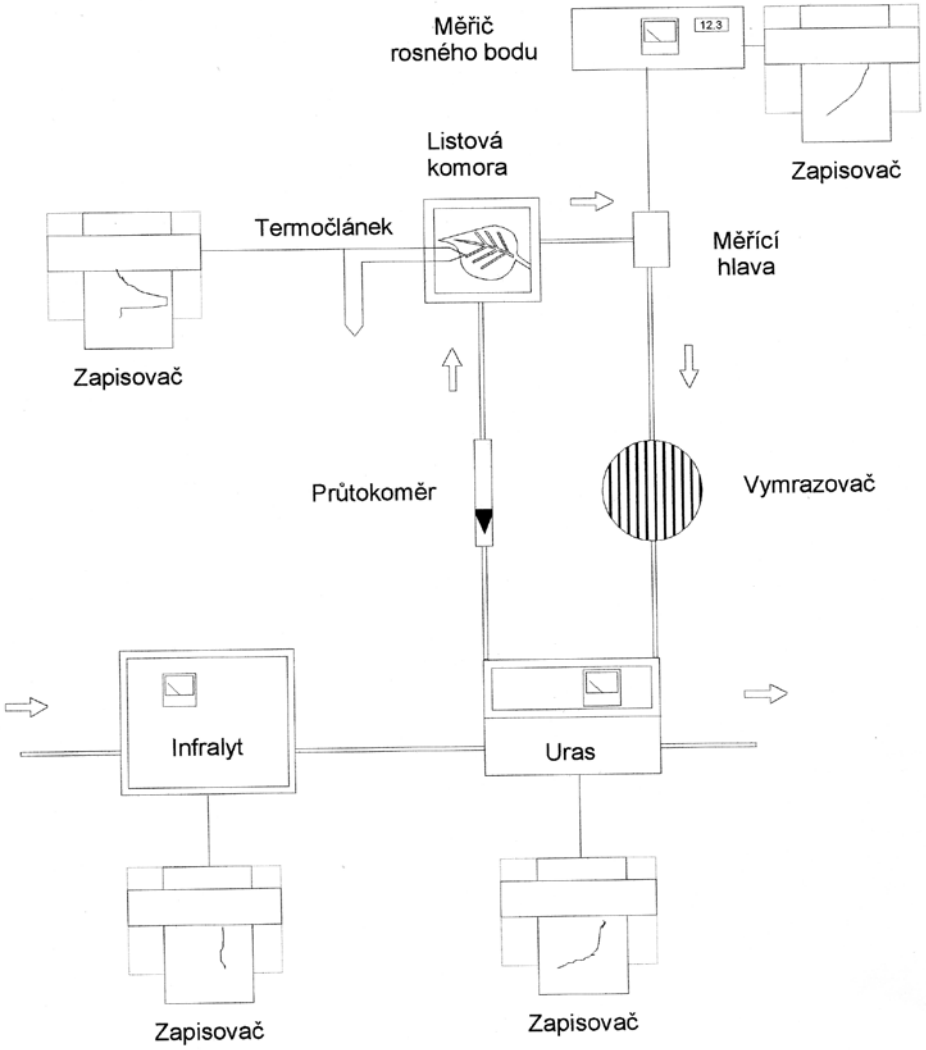
2.2 Metoda

2.2.1 Metodika měření rychlosti asimilace a transpirace v otevřeném systému

List byl při měření rychlosti výměny CO_2 a vodní páry v otevřeném gazometrickém systému uzavřen v průtočné listové komoře, do níž byla pouštěna definovanou rychlostí plynná směs o známé koncentraci CO_2 a H_2O. Rychlost výměny sledovaných plynů mezi listem a atmosférou v komoře byla určována z průtoku a změny koncentrace plynu mezi vstupem a výstupem z listové komory.
Otevřený gazometrický systém se dělí na část zdrojovou, v níž se připravuje plynná směs se stabilními vlastnostmi, a část měřící.



Zdrojová část laboratorního systému



Měřící část
laboratorního systému

29

Zdrojová část
Vzduch byl nejprve čerpán membránovou pumpou přes nádobu tlumící rázy, jehlový regulační ventil, absorbér CO_2 a vymrazovač vodní páry. Jako absorbér CO_2 bylo použito natronové vápno (absorbuje lépe při vyšší vzdušné vlhkosti). Suchý vzduch bez CO_2 byl dále obohacován o CO_2 v mísícím zařízení v hadičkách ze silikonové gumy obklopených plynným CO_2 (Apel a Lehmann, 1969). Výsledná koncentrace CO_2 závisela jednak na délce hadičky, kterou bylo možné měnit přepojováním dráhy plynu, jednak na průtoku plynu, udržovaném regulačním ventilem a manostatem. Konstantní průtok na výstupu zdrojové části byl zajišťován membránovou pumpou a regulačním ventilem. Vzdušná vlhkost byla stabilizována obohacením plynné směsi ve zvlhčovači, průtočné hadičce s vlhkým knotem, s následným vymražením na definovanou teplotu rosného bodu. Plynná směs se sníženou koncentrací O_2 se připravovala mísením vzduchu z tlakové láhve přes fritu do čistého dusíku. Koncentrace O_2 byla měřena paramagnetickým analyzátorem O_2 (Permolyt 3, Junkalor, NDR).
Měřící část
Koncentrace plynné směsi na vstupu měřící části se stanovovala infračerveným analyzátorem CO_2 (Infralyt 4, NDR), změna koncentrace CO_2 po průchodu listovou komorou infračerveným analyzátorem CO_2 (Uras 3G, Hartmann a Braun, SRN) v diferenčním zapojení s vyřazeným linearizačním zařízením. Kalibrační plyny byly míchány přesnými pumpami (Wösthoff, SRN). Kalibrační křivka prvního analyzátoru pracujícího v absolutním módu byla získána nelineární regresí pomocí exponenciální funkce (odpovídá Lambertovu Beerovu zákonu):

$$U = a \cdot (1 - e^{-b \cdot c_i^{CO_2}}) \qquad (2.2.1.A)$$

Diferenčně zapojený analyzátor byl kalibrován pomocí složitějšího výrazu, závislého i na absolutní koncentraci CO_2 odečtené prvním analyzátorem.

$$U = a + b \cdot e^{-d \cdot c_o^{CO_2}} - b \cdot e^{-d \cdot c_i^{CO_2}} \qquad (2.2.1.B)$$

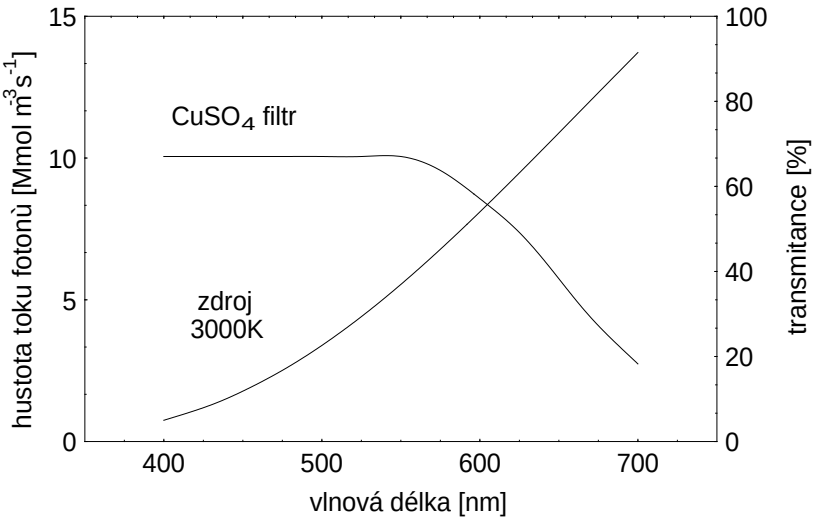
Průtok plynu do listové komory byl měřen plovákovým rotametrem. Rotametr byl okalibrován odečítáním rychlosti pohyblivých bublin tvořených tenzidem v odměrném válci. Vlhkost vzduchu v listové komoře byla stanovena měřičem rosného bodu (Waltz, Německo) pracujícím na principu zrcátka chlazeného Peltierovým efektem. Zpočátku byl pro měření použit méně přesný termočlánkový psychrometr domácí výroby.
Teplota listu byla měřena termočlánkem měď-konstantan s referenčním spojem v termostatované lázni. Tloušťka Cu drátu byla 0.05 mm a konstantanového 0.07 mm. Vztah mezi teplotou a napětím na termočlánku je

$$t = 0.02 + 26.04\ U - 0.63\ U^2 \qquad (2.2.1.C)$$

Jako zdroj světla byla použita halogenová žárovka HPZ 301 (220V/600W, Tesla) s teplotou chromatičnosti 3000K. Vyzařovací charakteristiku lze určit podle Planckova vyzařovacího zákona upraveného na molární jednotky:

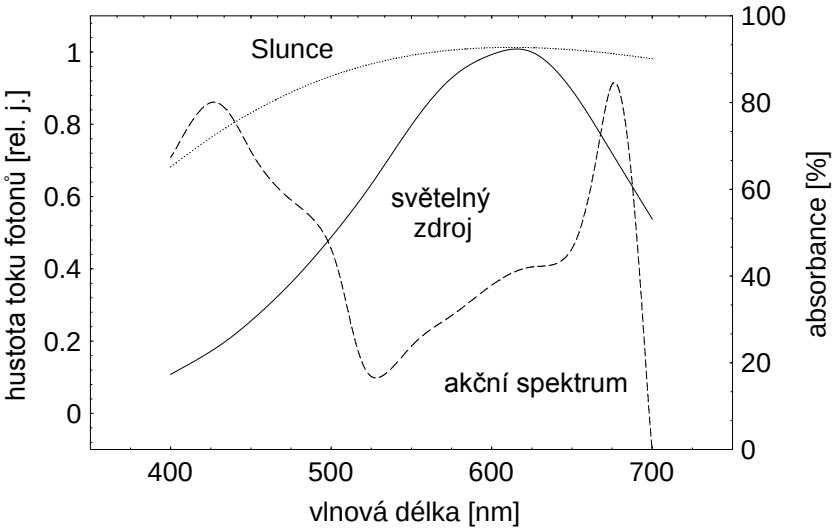
$$\frac{2\pi c}{\lambda^4 N_A \left(\exp(hc/k\lambda T) - 1\right)} \qquad (2.2.1.D)$$

Mezi světelným zdrojem a listovou komorou byl kvůli odstranění tepelného záření zařazen filtr tvořený vodou chlazeným roztokem síranu měďnatého. Jeho transmisní charakteristika byla určena na základě měření spektrofotometrem (M400, Zeiss).



Obrázek 2.2.1.A: Emisní spektrum halogenové žárovky s teplotou chromatičnosti 3000K v molárních jednotkách a transmisní charakteristika filtru s roztokem $CuSO_4$, použitého pro odstranění infračerveného záření.

Poloha maxima emise zdroje byla podobná jako u slunečního světla (teplota chromatičnosti 6000K), tvar maxima byl výrazně ostřejší. Výsledná účinnost, odhadnutá na základě zobrazeného akčního spektra, byla asi poloviční než účinnost monochromatického červeného světla s maximální účinností pro fotosyntézu.



Obrázek 2.2.1.B: Porovnání vypočteného emisního spektra světelného zdroje s emisním spektrem slunce v relativních molárních jednotkách. Pro porovnání účinností je čárkovaně schematicky vyznačeno akční spektrum zelené řasy.

2.2.2 Vyhodnocení výsledků měření v otevřeném gazometrickém systému

Tlak nasycených vodních par v závislosti na teplotě lze dobře vyjádřit Antoineovým vztahem s empirickými konstantami A, B, C (Hábr, 1975):

$$\ln\left(p_{sat}^{W}\right) = A - \frac{B}{t + C} \qquad (2.2.2.A)$$

konkrétně:

$$p_{sat}^{W} = 610.8 \cdot \exp\left(\frac{17.269 \cdot t}{237.3 + t}\right) \qquad (2.2.2.B)$$

Rychlost transpirace E byla vypočtena z formule

$$E = \frac{\left(p_{O}^{W} - p_{I}^{W}\right) \cdot f}{S \cdot R \cdot T} \qquad (2.2.2.C)$$

kde p_i a p_o jsou parciální tlaky vodní páry před a za listovou komorou, vypočtené z hodnot rosného bodu pomocí Antoineovy formule, f je průtok listovou komorou, S je listová plocha a R univerzální plynová konstanta. Podobně se vypočte rychlost čisté fotosyntézy P_N

$$P_{N} = \frac{\left(c_{I}^{C} - c_{O}^{C}\right) \cdot f \cdot p_{atm}}{S \cdot R \cdot T} \qquad (2.2.2.D)$$

kde c_i a c_o jsou koncentrace oxidu uhličitého před a za listovou komorou a p_{atm} je tlak vzduchu. Stomatální vodivost g_s pro vodní páru byla vypočtena pomocí (2.1.4.c):

$$g_{S}^{W} = \frac{E \cdot p_{atm}}{\left(p_{L}^{W} - p_{O}^{W}\right)} \qquad (2.2.2.E)$$

kde p_l je parciální tlak vodní páry uvnitř listu spočtený pomocí Antoineovy formule z teploty listu. Intercelulární koncentraci CO_2 byla vypočtena z (2.1.4.a):

$$c_{L}^{C} = c_{O}^{C} - 1.6 \cdot P_{N} / g_{S}^{W} \qquad (2.2.2.F)$$

2.2.3 Kultivace rostlin

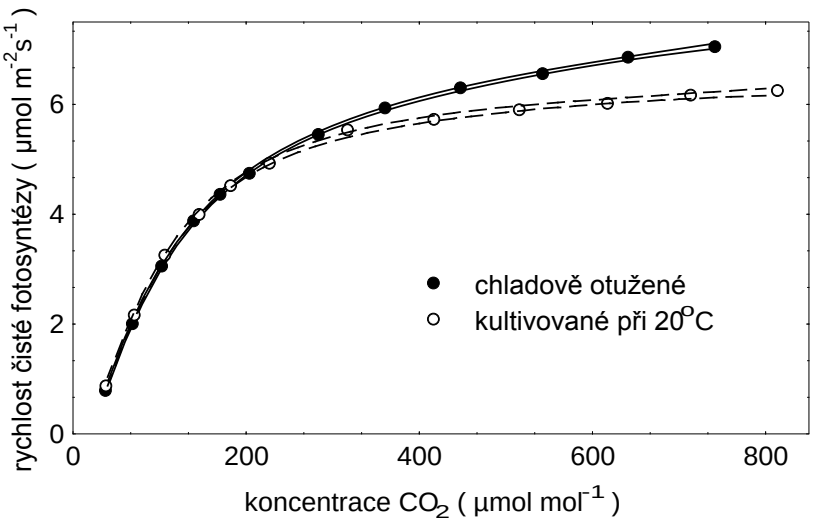
Rostliny ozimé pšenice, kultivary Mara, Zdar, Simona, Viginta a Mironovská 808, byly po naklíčení na vlhkém filtračním papíře uchyceny po 10 do skleněných lišt obložených molitanem a umístěny maximálně po 10 lištách do vaniček s živným roztokem. Obsah vaničky byl 6l a byl jednou týdně vyměňován. Složení plného Hoaglandova živného roztoku bylo 2.36 g $Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$, 1.12 g KNO_3, 0.27 g KH_3PO_4, 0.49 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 1 ml roztoku citrátu Fe v koncentraci 0.5% na 1 l vody. Kultivace probíhala v klimaboxu při 15°C, 200 µmol $m^{-2}s^{-1}$ světla a fotoperiodě 16 hodin do plného vývinu druhého listu. Následné otužování probíhalo při 5°C, další podmínky byly stejné jako při předchozí kultivaci.

2.2.4 Popis experimentu

Duralová listová komora s vodou chlazeným pláštěm a světelným filtrem byla chlazena ultratermostatem tak, aby bylo dosaženo teploty listu 5°C. Před sledováním průběhu indukce byla rostlina alespoň 30 min potmě.

2.3 Výsledky

U neadaptovaných rostlin pšenice měřených při 5°C při zvyšování koncentrace CO_2 nad běžné hodnoty nedochází k takovému zvyšování rychlosti fotosyntézy jako u rostlin chladově aklimovaných (obrázek 2.2.4.a). Hodnota kompenzační koncentrace CO_2 je poměrně nízká, kolem 10 µmol mol^{-1} a nebylo zjištěno, že by se během aklimace měnila.



Obrázek 2.2.4.A: Rychlost čisté fotosyntézy v závislosti na intercelulární koncentraci CO_2 při teplotě 5°C a intenzitě světla 500µmol $m^{-2}s^{-1}$. Čárkovaně a prázdnými kroužky je vyznačeno měření neaklimovaných rostlin, plnými čarami a kroužky je vyznačeno měření rostlin otužovaných 7 dní při teplotě 5°C. Data byla fitována obecnou hyperbolickou funkcí, vyznačeny jsou konfidenční pásy na hladině 95%.

odrůda	*neotužené*	*otužené*
Mironovská 808	0.5	0.9
Mara	0.3	0.5
Viginta	0.3	0.7
Zdar	0.2	0.5
Simona	0.1	0.6

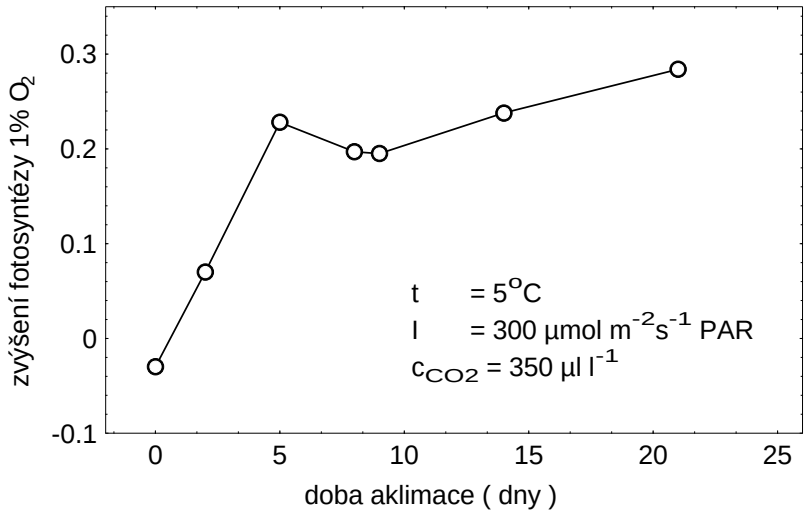
Tabulka 2.2.4.A: Relativní citlivost rychlosti čisté fotosyntézy ke zvýšení koncentrace CO_2 v mmol mol^{-1} pro 5 kultivarů ozimé pšenice uvedených v pořadí podle mrazuvzdornosti.

Měření závislosti rychlosti čisté fotosyntézy na koncentraci CO_2 v nízké teplotě bylo provedeno pro neotužené a otužené rostliny pěti kultivarů ozimé pšenice, výrazně se lišících v mrazuvzdornosti. Data byla fitována obecnou hyperbolickou funkcí

$$\left(P_N - \left(\alpha_1 \cdot c_L^C + \beta_1\right)\right) \cdot \left(P_N - \left(\alpha_2 \cdot c_L^C + \beta_2\right)\right) = \gamma$$

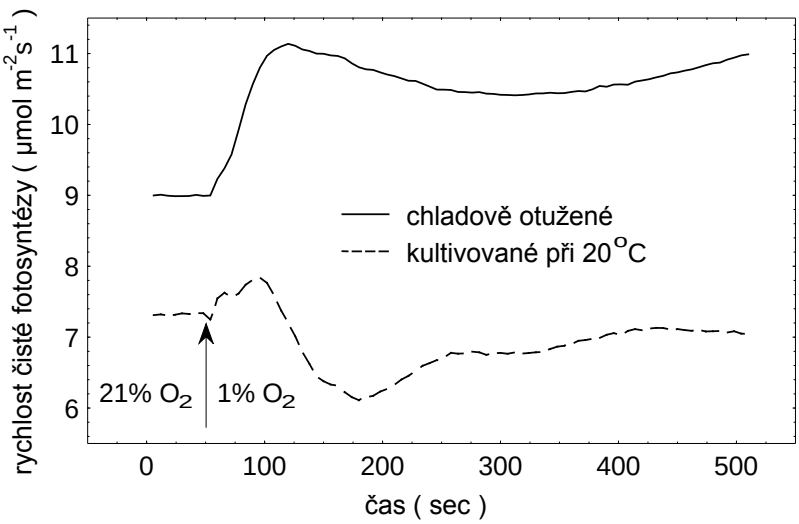
a z derivace takto získané závislosti P_N na intercelulární koncentraci CO_2 dělené P_N při koncentraci CO_2 rovné 600 µmol mol^{-1} byla stanovena relativní citlivost fotosyntézy ke

zvyšování koncentrace CO_2. Citlivost fotosyntézy k CO_2 před otužením je nízká a koreluje s mrazuvzdorností otužených rostlin, po otužení pak výrazně vzroste (tabulka 2.2.4.a).



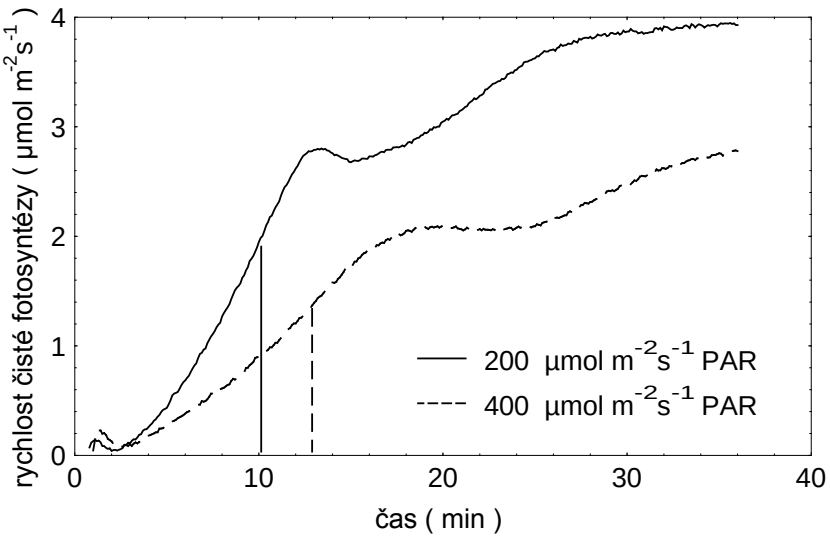
Obrázek 2.2.4.B: Relativní zvýšení fotosyntézy po snížení koncentrace O_2 na 1% v průběhu otužování rostlin pšenice v nízké teplotě (Janáček a Prášil, 1992).

Protože se nízká teplota projevuje ve fotosyntéze C_3 rostlin rovněž nepřítomností Warburgova efektu - snížením koncentrace O_2 se fotosyntéza nezvýší, sledovali jsme průběh aklimace rostlin ozimé pšenice pomocí změn v rychlosti čisté fotosyntézy po snížení koncentrace kyslíku (obrázek 2.2.4.b, též Janáček a Prášil, 1992). Po 5ti dnech aklimace v nízké teplotě byl Warburgův efekt plně obnoven.
Přechodový jev po snížení kyslíku, který nastává (obrázek 2.2.4.c) u neaklimovaných rostlin, je typický pro podmínky navozující limitaci spotřebou asimilátů (Viil a kol, 1977) a je doprovázen přechodným poklesem koncentrace redukovaných metabolitů Calvinova cyklu, rovnováha je patrně znovunastolena snížením aktivity enzymů C_3 cyklu, zejména Rubisco (Schnyder a kol., 1986).



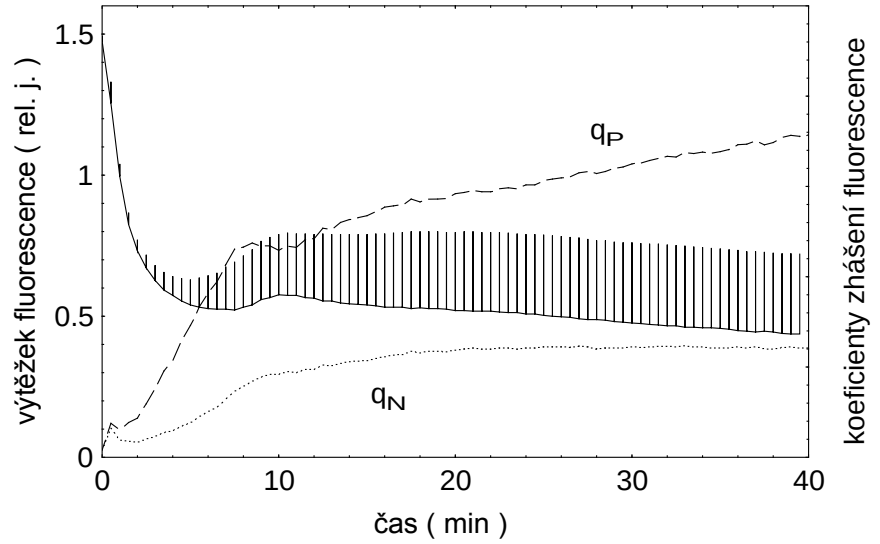
Obrázek 2.2.4.C: Přechodový jev v rychlosti čisté fotosyntézy při 5°C po snížení koncentrace O_2 na 1%. Neaklimované rostliny reagují přechodným poklesem fotosyntézy, typickým pro O_2 insenzitivní fotosyntézu.

Při indukci fotosyntézy v nízké teplotě po osvětlení byl nápadný poměrně rychlý nárůst rychlosti čisté fotosyntézy s vyraznou oscilací. Během otužování se indukce výrazně zpomaluje a oscilace mizí (Janáček a Prášil, 1992). K oscilaci docházelo po fixaci asi 0.65 mmol CO_2 m^{-2} nezávisle na intenzitě ozářenosti (obrázek 2.2.4.d).



Obrázek 2.2.4.D: Indukce fotosyntézy v nízké teplotě u neaklimovaných rostlin pšenice při dvou intenzitách světla. Svislými čarami je vyznačen počátek oscilace, určený z derivace indukční křivky, k němuž došlo v obou případech po fixaci 0.65 mmol m^{-2} CO_2.

Oscilace v indukci se projevila i na průběhu koeficientu fotochemického zhášení fluorescence měřeného za nízké teploty (obrázek 2.2.4.e).



Obrázek 2.2.4.E: Průběh modulované fluorescence a koeficientu fotochemického a nefotochemického zhášení při indukci fotosyntézy v nízké teplotě. Měření na PAM laskavě provedla Dr. Synková z ÚEB Praha.

2.4 Diskuse

Uvedené výsledky ukazují, že už během prvního týdne aklimace rostlin ozimé pšenice k nízké teplotě dochází k výrazným změnám v citlivosti ke koncentraci oxidu uhličitého a kyslíku, podobně jako při dlouhodobém otužování rostlin žita popsaném v práci Huner a kol. 1986. Necitlivost fotosyntézy ke zvyšování CO_2 nad běžné hodnoty, ke snižování koncentrace O_2, oscilace při indukci fotosyntézy a po snížení koncentrace O_2 u neaklimovaných rostlin svědčí o limitaci fotosyntézy spotřebou asimilátů. Všechny popsané jevy se ztrácejí během otužení. Kompenzační koncentrace CO_2 se během otužování nemění, a tedy ke změnám ve specificitě Rubisco a fotorespiraci, považovaných v práci Huner a kol. (1986) nebo Lehnerr a kol. (1985) za příčinu O_2 necitlivosti, patrně během otužování nedochází,
Odolnost kultivarů ozimé pšenice k mrazu korelovala s citlivostí neotužených rostlin ke zvýšení koncentrace CO_2 v nízké teplotě. To by bylo vysvětlitelné vyšší chladuvzdorností ve spotřebě asimilátů u odolnějších kultivarů. Korelaci mezi odolností kultivarů ozimé pšenice a některou charakteristikou výměny plynů po aklimaci, jako třeba kapacitou fotosyntézy u obilnin od jarní pšenice po ozimé žito (uvedeno v práci Öquist a Huner, 1993), se objevit nepodařilo. To se dá vysvětlit buď menším rozsahem odolnosti u použitého materiálu nebo rozdíly v délce otužování.

3 Působení stresu nedostatkem vody a koncentrace oxidu uhličitého na rostliny.

3.1 Úvod

3.1.1 Vodní potenciál a růst buňky

Vodní potenciál je chemický potenciál vody, dělený parciálním molárním objemem vody, má rozměr tlaku. Lze ho s velkou přesností určit ze snížení parciálního tlaku vodní páry nad vzorkem oproti tlaku nad čistou vodou.

$$\Psi_W = \frac{\mu_W - \mu_0}{\overline{V}_W} = \frac{RT}{\overline{V}_W} \cdot \ln\left(p/p_{sat}\right) \qquad (3.1.1.A)$$

Pro zředěné roztoky nedisociujících látek platí přibližně van't Hoffův vzorec, udávající závislost vodního potenciálu na molaritě

$$\Psi_W = -RTC \qquad (3.1.1.B)$$

Vodní potenciál rostlinné buňky je součtem tlakového a osmotického potenciálu (případně též matričního a gravitačního potenciálu).
Objemový nárůst rostlinné buňky je výsledkem transportu vody do buňky proti gradientu vodního potenciálu a expanze buněčné stěny. Limitující pro růst může být hydraulická vodivost (Lp) nebo plastická roztažnost buněčné stěny (m). Rovnovážná hodnota rychlost růstu buňky je dána formulí

$$\frac{1}{V}\frac{dV}{dt} = \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{L_p}\right) \cdot \left(\sigma\Delta\pi - Y\right) \qquad (3.1.1.C)$$

odvozenou (Lockhart, 1965) pro rostoucí buňky řasy Nitella, kde V je objem buňky, σ je reflexní koeficient, $\Delta\pi$ je rozdíl osmotického potenciálu mezi vnějškem a vnitřkem buňky a Y tlak kritický pro růst.

3.1.2 Transpirační proud a růst listu

Sledování pohybu vody listem pomocí značení transpiračního proudu ukázalo, že v pšeničném listu má největší odpor mestomová pochva svazků cévních (Canny, 1988).
Listy trav rostou z bazálního meristému, který je i s celou růstovou zónou listu chráněn listovou pochvou listu staršího. Konečná velikost listu je ovlivňována charakteristikami vodního provozu během růstu. Voda nutná pro růst musí procházet meristémem, v němž jsou vodivá pletiva dosud málo vyvinutá. Růst listů trav tedy může být limitován kromě gradientu osmotického potenciálu i hydraulickou vodivostí pro vodu ze zdroje do rostoucích se buněk (3.1.1.c) (Barlow, 1986).

3.1.3 Působení stresu nedostatkem vody na rostliny

Stres nedostatkem vody se u rostlin projevuje nejprve zpomalením dlouživého růstu (Hsiao, 1973). Zatímco silný stres způsobuje ztrátu turgoru nutného pro růst (3.1.1.c) až vadnutí, při začínajícím stresu se turgor v rostoucí zóně zachovává a příčinou zpomalení růstu je buď změna vlastnosti buněčných stěn, konkrétně snížení plasticity nebo zvýšení hodnoty turgoru

kritické pro růst (Barlow, 1986), nebo vymizení gradientu vodního potenciálu, nutného pro transport vody do buněk (Nonami a Boyer, 1989).
Inhibice fotosyntézy při nedostatku vody je způsobena hlavně zavíráním stomat (Chaves, 1990). Rolování nebo skládání listů u některých druhů snižuje projektivní listovou plochu, tedy příjem světla, a zvyšuje odpor hraniční vrstvy. Snížený růst vede k menší spotřebě asimilátů a k jejich hromadění v listu. Interakce sucha se silným světlem způsobuje fotoinhibici, která je menší v případě srolovaných listů, a vyšší nefotochemické zhášení (Corlett a kol., 1994). Sucho se projevuje v rychlosti asimilace dříve než ve fluorescenci chlorofylu (Jones a kol., 1990). Fotosyntetická kapacita mezofylu se snižuje v závislosti na relativním obsahu vody podobně u xero-, mezo- i hygrofytů (Kaiser. 1987), 50% pokles relativního obsahu vody má za následek 40-60% poklesu kapacity. Příčinou zpomalení metabolizmu je zřejmě inhibice některého enzymu v dráze regenerace RuBP (Gunasekera a Berkowitz, 1993).
Osmotické přizpůsobení je aktivní hromadění nízkomolekulárních látek v buňkách vyvolané stresem nedostatkem vody; pokles vodního potenciálu je tak větší, něž kdyby byl vyvolán pouze dehydratací. Podílí se něm zejména draselné kationty, cukry, anionty organických kyselin a prolin. Osmotické přizpůsobení umožňuje udržení buněčného turgoru a gradientu potenciálu pro transport vody. Negativním důsledkem je zvýšení viskozity buněčného obsahu a tedy pomalejší transport látek difúzí, proto je osmotické přizpůsobení rostlin účelné pouze ve stresových podmínkách a snad proto jsou běžné zásobní formy asimilátů převážně vysokomolekulární látky - škrob, fruktany. Z energetického hlediska není osmotické přizpůsobení náročné: příjem uhlíku se při suchu snižuje, hromadění asimilátů vyžaduje menší metabolické náklady než produkce strukturních látek a je při něm prodýcháno méně asimilátů (McCree, 1986)
Způsob ochrany proti stresu nedostatkem vody je u většiny suchozemských rostlin vyhnutí se (avoidance) dehydrataci. Výrazná tolerance k dehydrataci se vyskytuje pouze u poikilohydrických rostlin (ressurection plants). Mechanismy vyhnutí se mohou být zaměřeny jednak na omezení spotřeby vody - zavírání stomat, rolování listů, opad listů, snížený růst a zkrácená doba ontogenetického vývoje, jednak na zajištění spotřeby vody - osmotické přizpůsobení, zvýšené poměru kořen/nadzemní část (Levitt, 1980).
Strategie rostliny při stresu nedostatkem vody je určena tím, jaký je podíl jednotlivých obranných mechanismů na přizpůsobení (pojem strategie je snad namístě i u těchto neuvědomělých, ale z hlediska přežití účelných reakcí). Takto definovaný typ strategie při stresu nedostatkem vody je geneticky podmíněn u rostlinných druhů a projevuje se v rozdílné schopnosti osmotického přizpůsobení u genotypů pšenice (Morgan, 1984) nebo ječmene (Blum, 1989). Úspěšnost strategie, která může být hodnocena z hlediska produktivity, individuálního přežití nebo přežití druhu, závisí na intenzitě a trvání stresu a kompetici o vodu s jinými rostlinami.
Při studiu odolnosti genotypů obilovin ke stresu nedostatkem vody pomocí gazometrických měření se zjistilo, že genotypy odolnější k suchu si při nedostatku vody zachovávají vyšší relativní obsah vody a kapacitu fotosyntézy (Ritchie a kol., 1990) a stomatální vodivost (Johnson a kol., 1987). To může být důsledek odlišné strategie odolných genotypů při překonávání stresu nedostatkem vody.

3.1.4 Cíl práce

1) Vyvinout a pomocí sledování dlouživého růstu otestovat metodu vyvolání definované úrovně stresu nedostatkem vody při kultivaci rostlin a měření výměny plynů v řízených podmínkách pomocí roztoků polyetylenglykolu o vysoké molekulové hmotnosti.

2) Pomocí fitování mechanismových modelů metabolismu fotosyntézy na experimentální data stanovit vliv stresu nedostatkem vody na výměnu plynů listem při různých koncentracích CO_2 a definovaných úrovních stresu nedostatkem vody. Metodu ohodnocení podílu stomat a biochemických reakcí na limitaci fotosyntézy odvodit na základě analýzy řízení metabolismu fotosyntézy (Woodrow a kol., 1990).

3.2 Metoda

3.2.1 Modelové funkce pro stomatální vodivost a rychlost čisté fotosyntézy

Regresí výsledků gazometrických měření rychlosti čisté fotosyntézy lze získat lineární závislost stomatální vodivosti a hyperbolickou závislost rychlosti čisté fotosyntézy na intercelulární koncentraci CO_2.

$$g_S = a\, c_i + b \qquad (3.2.1.A)$$

$$P_N = \frac{P_{max} \cdot (c_i - \Gamma)}{c_i + 2.33\Gamma} - R_D \qquad (3.2.1.B)$$

3.2.2 Stanovení podílu stomat a biochemických procesů na limitaci fotosyntézy.

Nechť je známa závislost rychlosti čisté fotosyntézy na intercelulární koncentraci CO_2 - příjmová funkce mezofylu D(c) a stomatální vodivost pro CO_2 - převrácená hodnota směrnice zdrojové funkce S(c). Předpokládáme, že příjmová funkce je přímo úměrná veličině R, odpovídající fotosyntetické kapacitě mezofylu. Při transportu CO_2 listem platí rovnost zdrojové a příjmové funkce

$$S(c_i(g,R),g)-D(c_i(g,R),R)=0$$

Formálním zderivováním podle g a R dostaneme:

$$\frac{dS}{dc_i}\cdot\frac{dc_i}{dg}+\frac{dS}{dg}-\frac{dD}{dc_i}\cdot\frac{dc_i}{dg}=0 \qquad \frac{dS}{dc_i}\cdot\frac{dc_i}{dR}-\frac{dD}{dc_i}\cdot\frac{dc_i}{dR}-\frac{dD}{dR}=0$$

Označíme D’ derivaci příjmové funkce podle c_i, dosadíme derivace zdrojové funkce a použijeme přímé úměrnosti příjmové funkce na R.

$$-g\cdot\frac{dc_i}{dg}+(c-c_i)-D'\cdot\frac{dc_i}{dg}=0 \qquad -g\cdot\frac{dc_i}{dR}-D'\cdot\frac{dc_i}{dR}-\frac{D}{R}=0$$

Odtud spočteme derivace c_i:

$$\frac{dc_i}{dg}=\frac{(c-c_i)}{g+D'} \qquad \frac{dc_i}{dR}=-\frac{D}{R}\cdot\frac{1}{g+D'}$$

Vyjádříme derivace fotosyntézy a po dalších úpravách dostaneme řídící koeficienty:

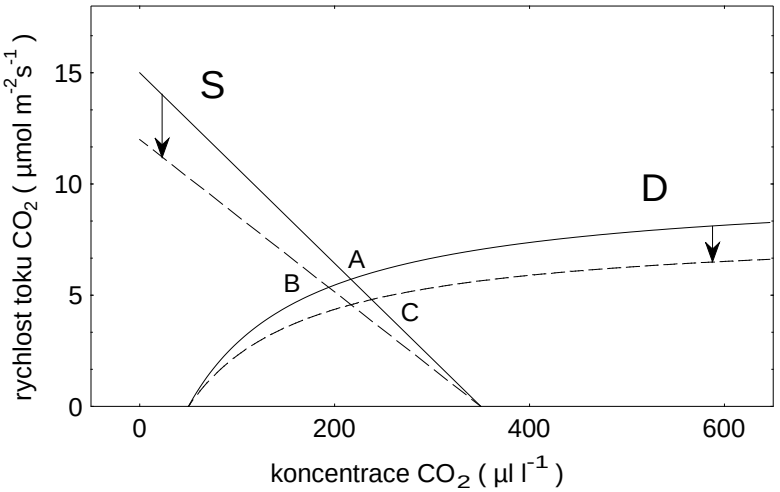
$$\frac{dA}{dg}=\frac{dD}{dc_i}\cdot\frac{dc_i}{dg}=D'\cdot\frac{dc_i}{dg} \qquad \frac{dA}{dR}=\frac{dS}{dc_i}\cdot\frac{dc_i}{dR}=-g\cdot\frac{dc_i}{dR}$$

$$\frac{dA}{dg} = D'.\frac{(c-c_i)}{g+D'} \qquad \frac{dA}{dR} = g.\frac{D}{R}.\frac{1}{g+D'}$$

$$\frac{g}{A}.\frac{dA}{dg} = D'.\frac{(c-c_i).g}{A}.\frac{1}{g+D'} \qquad \frac{R}{A}.\frac{dA}{dR} = g.\frac{1}{g+D'}$$

$$C_S = \frac{g}{A}.\frac{dA}{dg} = \frac{D'}{g+D'} \qquad C_M = \frac{R}{A}.\frac{dR}{dA} = \frac{g}{g+D'} \qquad (3.2.2.A)$$

Řídící koeficient pro stomata, C_S, udává podíl relativní změny fotosyntézy, vyvolané změnou stomatální vodivosti, a relativní změny stomatální vodivosti. Čím je větší, tím je fotosyntéza více limitována stomaty. Podobně pro mezofyl.



Obrázek 3.2.2.A: Ilustrace odvozených vztahů pro koeficienty stomatální a mezofylové limitace fotosyntézy. Jsou nakresleny stejné relativní poklesy zdrojové funkce S(c) a příjmové funkce D(c) (viz příloha B). Jelikož má D(c) menší směrnici v průsečíku A, je pokles rychlosti fotosyntézy na hodnotu B (vyvolaný poklesem stomatální vodivosti a podle vzorečku úměrný C_S) vskutku menší nežli pokles na hodnotu C (vyvolaný poklesem mezofylové kapacity a úměrný C_M).

Součet všech řídících koeficientů je 1.0 pokud jsou rychlosti izolovaných procesů úměrné parametrům, pro něž jsou kontrolní koeficienty definovány. To je v případě stomatální vodivosti splněno. Pro mezofylový koeficient by to platilo například tehdy, kdyby se neměnil druh limitace (Rubiscem, světlem, sinkem) a R by byla kapacita limitující složky.
Je-li rychlost fotosyntézy vyjádřena vztahem (3.2.1.b), platí pro derivaci D'

$$D' = P_N' = \frac{P_{max} \cdot 3.33 \cdot \Gamma}{(c_i + 2.33\Gamma)^2} \qquad (3.2.2.B)$$

3.2.3 Měření vodního potenciálu termočlánkovým hygrometrem.

Termočlánkovým hygrometrem HR33T (Logan, USA) lze měřit vodní potenciál vzorků rostlinného pletiva či roztoků metodou rosného bodu. Vodní potenciál odpovídá určité hodnotě snížení tlaku vodní páry nad vzorkem oproti tlaku nasycené páry při teplotě vzorku. Termočlánkový spoj obalený kapkou čisté vody je ochlazován pod teplotu vzorku procházejícím proudem a při určitém podchlazení má nasycená vodní pára při teplotě termočlánku stejný tlak jako pára nad vzorkem a nastává energetická rovnováha.

Vysrážení kapky na spoji se děje zapojením chladícího proudu. Během vlastního měření se periodicky přepíná mezi chlazením definovaným proudem (tzv πw set charakteristický pro daný spoj a teplotu) odpovídajícímu energetické rovnováze suchého spoje a mezi měřením teploty termočlánku.

Přístroj ukazuje hodnoty napětí v mikrovoltech odpovídající snížení teploty spoje. Přístroj kalibrujeme roztoky NaCl o koncentracích do 2M, pro které jsou hodnoty vodního potenciálu známé (Wiebe a kol, 1971).

Z principu měření je zřejmé, že velmi záleží na stabilní teplotě měření. Teplota ovlivňuje i hodnotu πw setu. Dosažení teplotní rovnováhy a rovnováhy v tlaku vodní páry mezi vzorkem a atmosférou v měřící komůrce může při velkém odporu k difúzi vodní páry trvat i řádově hodiny.

Měření intaktních částí rostliny obvykle znemožňují tepelné gradienty a obtíže s utěsněním měřící komory. Vodní potenciál odděleného vzorku se může po oddělení změnit díky relaxaci tenze vodního sloupce v xylému. Růst pletiva, redistribuce vody či iontů a metabolické změny během ekvilibrace rovněž mohou měnit odečtenou hodnotu. Vadí i teplotní gradient vzniklý z tepla uvolněného dýcháním.

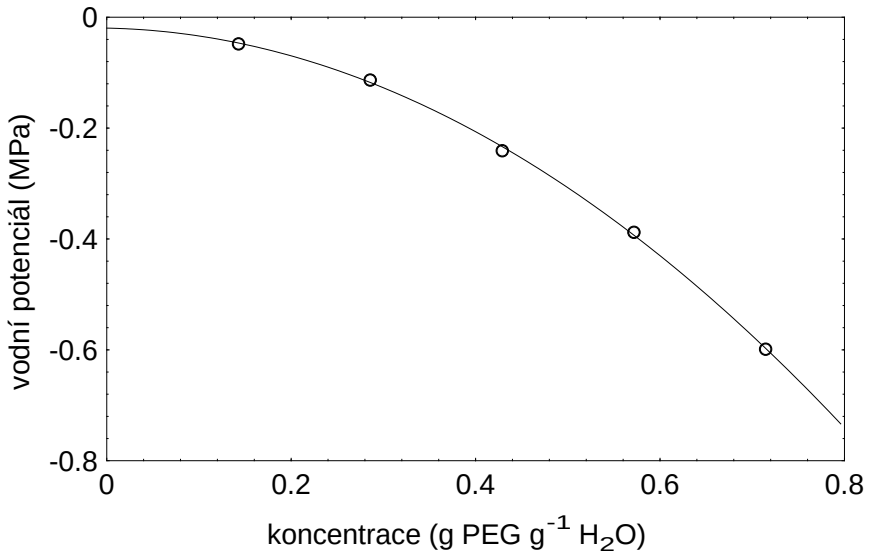
Buněčný obsah pro měření osmotického potenciálu rostlinného pletiva získáváme rozrušením pletiva buď pomocí mražení nebo vymačkáním. Vymačkáním se zpravidla dostane řidší roztok (Kikuta a Richter, 1992).

3.2.4 Osmotický potenciál vodních roztoků PEG.

Závislost vodního potenciálu roztoku PEG na koncentraci vyjádřené v kilogramech PEG na kilogram vody lze vyjádřit takto (McCledon, 1981):

$$-\Psi_W = \frac{RT}{M}c + RTA_2c^2 \qquad (3.2.4.A)$$

kde M je molekulová hmotnost, A_2 je (empirický) druhý viriální koeficient. McCledon získal hodnoty pro PEG 6000 při 25°C M=6600 kg $kmol^{-1}$, $A_2=4.3*10^{-3}$ kmol kg^{-1}.



Obrázek 3.2.4.A: Vodní potenciál roztoků PEG 8000 v závislosti na koncentraci. Čára zobrazuje výsledek fitování dat parabolickou funkcí. Molekulová hmotnost vyšla 7500 g mol^{-1}, druhý viriální koeficient A_2 z (3.2.4.a) vyšel $4.4*10^{-3}$ mol g^{-1}.

McCledon z literárních údajů zjistil lineární klesající závislost A_2 na teplotě, tak, že při zhruba 80°C je A_2 nulové. To lze vysvětlit tak, že při nízkých teplotách ve vysokých koncentracích mají jednotlivé lineární makromolekuly PEG tendenci interagovat mezi sebou, jsou natažené a tedy se chovají jako větší množství víceméně nezávislých molekul. Naopak při vyšších teplotách nebo v nízkých koncentracích jsou molekuly PEG sbaleny do kuliček a roztok se chová podle van't Hoffova zákona (3.1.1.b):

$$-\Psi_W = \frac{RT}{M}c \qquad (3.2.4.B)$$

3.3 Výsledky

3.3.1 Dlouživý růst dvou kontrastních odrůd pšenice

V této fázi práce šlo o stanovení rozsahu koncentrací PEG vhodných k navození simulovaného stresu nedostatkem vody pro účely další práce.
Stres nedostatkem vody byl u klíčních rostlin pšenice navozen různými koncentracemi polyetylenglykolu (PEG 8000, Sigma) v živném roztoku. Byly použity odrůdy ozimé pšenice Chlumecká 12 - stará česká odrůda a Mexico 50/B21 - odrůda s geny zakrslosti. Úroveň stresu byla sledována pomocí dlouživého růstu listů.
Obilky byly naklíčeny na vlhkém filtračním papíře ve tmě při 20°C, po 4 dnech byly klíční rostliny uchyceny do lišt a přeneseny do živného roztoku na světlo o intenzitě 250 μmol $m^{-2}s^{-1}$, délka dne činila 14 h, teplota byla 20°C ve dne a 15°C v noci. Po třech dnech byly klíční rostliny přeneseny do živného roztoku s PEG. Pro každou odrůdu byly v každé variantě 2 lišty po 12 rostlinách umístěny v ploché misce o objemu 150 ml, zajištěné proti odpařování. Délka listu byla měřena ručně po dvou nebo třech dnech u 12 rostlin od každé varianty. Denní minimum osmotického potenciálu bylo buď měřeno přímo, nebo spočteno z hmotnosti zbylého živného roztoku před doplněním pomocí formule (3.2.4.a). Živný roztok byl

doplňován na konstantní váhu misky vždy na konci světelné periody. Použitý 50% Hoaglandův živný roztok měl složení 1.18 g $Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$, 0.506 g KNO_3, 0.136 g KH_3PO_4, 0.245 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 1 ml roztoku citrátu Fe v koncentraci 0.5% na 1 l vody, počáteční koncentrace PEG (tabulka 3.3.1.a).

	g PEG/g roztoku	potenciál [MPa]
kontrola	0.12	-0.17
stres	0.21	-0.5

Tabulka 3.3.1.A: Počáteční koncentrace PEG v živném roztoku.

Pro každý jednotlivý druhý list byla změřena konečná délka (tabulka 3.3.1.b). Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny t-testem.

	Chlumecká 12		Mexico 50/B21	
	kontrola	stres	kontrola	stres
délka [mm]	285	220	140	92
CV	± 13.7%	± 24.9%	± 12.5%	± 26%
ψ_{min} [MPa]	-0.21	-0.61	-0.21	-0.38

Tabulka 3.3.1.B: Konečná délka 2. listu a průměrný minimální osmotický potenciál živného roztoku pro dvě varianty a dvě odrůdy ozimé pšenice. ψ_{min} je průměr denních minim v průběhu celé kultivace.

Obě odrůdy reagovaly snížením rychlosti růstu, Chlumecká vyrostla více a reagovala menším relativním snížením růstu: 77% oproti 66% u odrůdy Mexico. Odrůda Mexico díky menšímu růstu spotřebovala ve stresované variantě menší množství vody než odrůda Chlumecká a tedy dosahovala vyšších hodnot vodního potenciálu živného roztoku ke konci světelné periody. U stresované varianty vyšel téměř dvojnásobný koeficient variance konečné délky listu.
Z lineární regrese závislosti délky každého jednotlivého listu na čase byl extrapolací vypočten čas začátku růstu a celková doba růstu (tabulka 3.3.1.c). Mezi kontrolou a stresovanou variantou nebyly nalezeny rozdíly v době začátku růstu druhého listu ani v trvání růstu. Časové údaje jsou ve dnech.

růst 2.listu:	Chlumecká 12	Mexico 50/B21
začátek	6.2	4.9
doba	7.6	8.5

Tabulka 3.3.1.C: Čas začátku a doba růstu druhého listu (dny), získané extrapolací lineární části růstové křivky do 0 a maximální délky listu.

Protože se vodní stres se neprojevil zpožděním začátku ani prodloužením doby vývoje druhého listu, lze usuzovat, že byl výrazně ovlivněn pouze dlouživý růst a nikoliv dělení buněk nebo ontogenetický vývoj, který je závislý na stavu vzrostného vrcholu.

3.3.2 Limitace fotosyntézy v řízených podmínkách

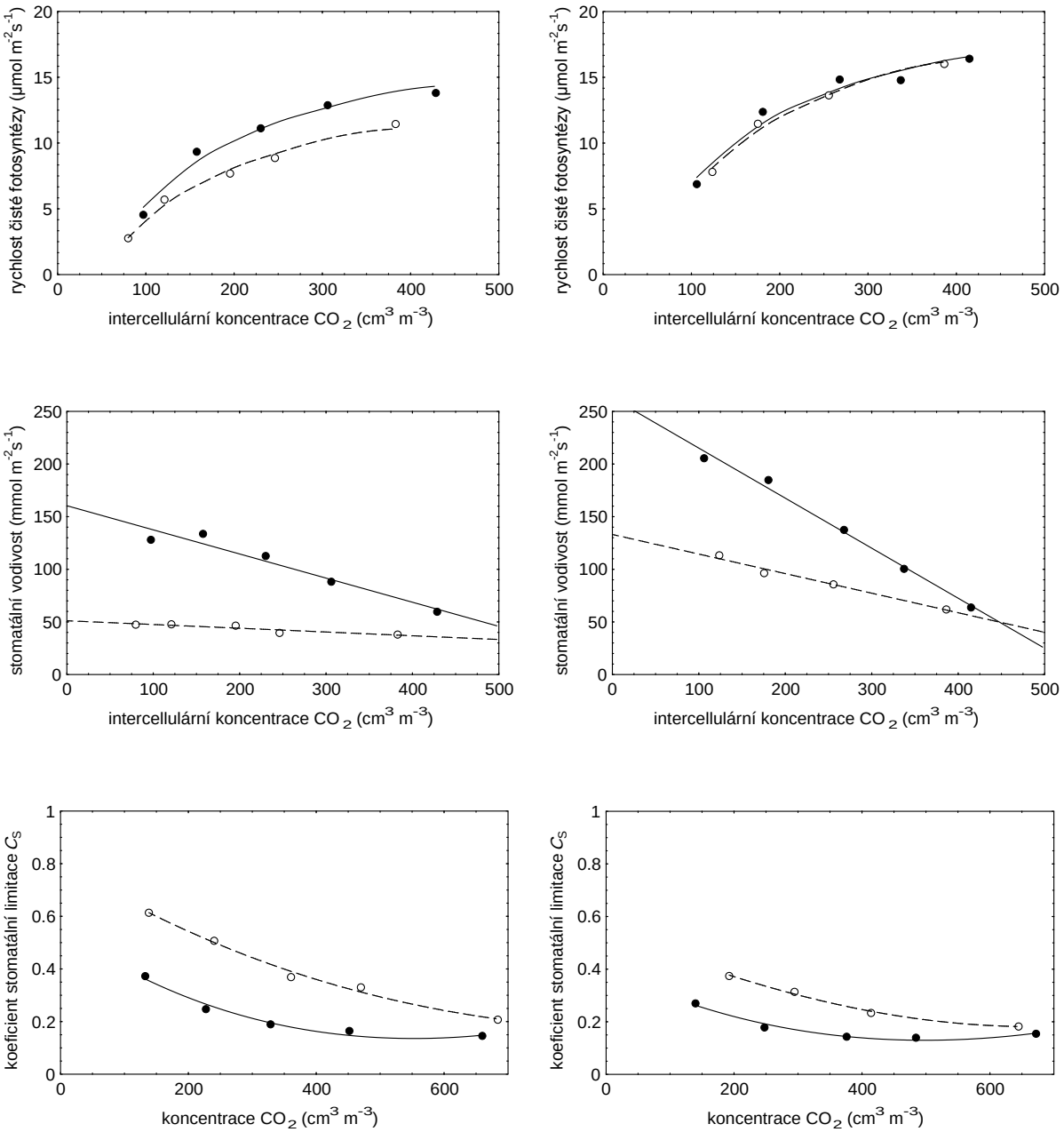
Rostliny kultivarů Chlumecká 12, Mexico 50/B21 a Zdar byly pěstovány v živném roztoku obsahujícím PEG o osmotickém potenciálu -0.21 MPa při podmínkách popsaných v předešlé kapitole, do plného vývinu druhého listu.
Vliv stresu nedostatkem vody a koncentrace CO_2 na hodnotu stomatální limitace fotosyntézy byl odhadován z rychlosti fotosyntézy a transpirace stanovené z rychlosti výměny plynů měřené v laboratorním otevřeném systému. Koncentrace CO_2 byla od 100 do 800 μmol mol^{-1}, ozářenost 400 μmol $m^{-2}s^{-1}$ PAR, teplota listu 22.5-23.5°C. Osmotický potenciál živného roztoku byl během měření snižován pomocí roztoků PEG. Hodnota osmotického potenciálu živného roztoku byla měřena po skončení gazometrického měření termočlánkovým psychrometrem HR-33T (Wescor, USA).
Dále (obrázek 3.3.2.a) jsou uvedeny výsledky měření vyhodnocené regresní analýzou.

Chlumecká 12-1

kontrola: -.23 MPa, stres: -0.97 MPa

Chlumecká 12-2

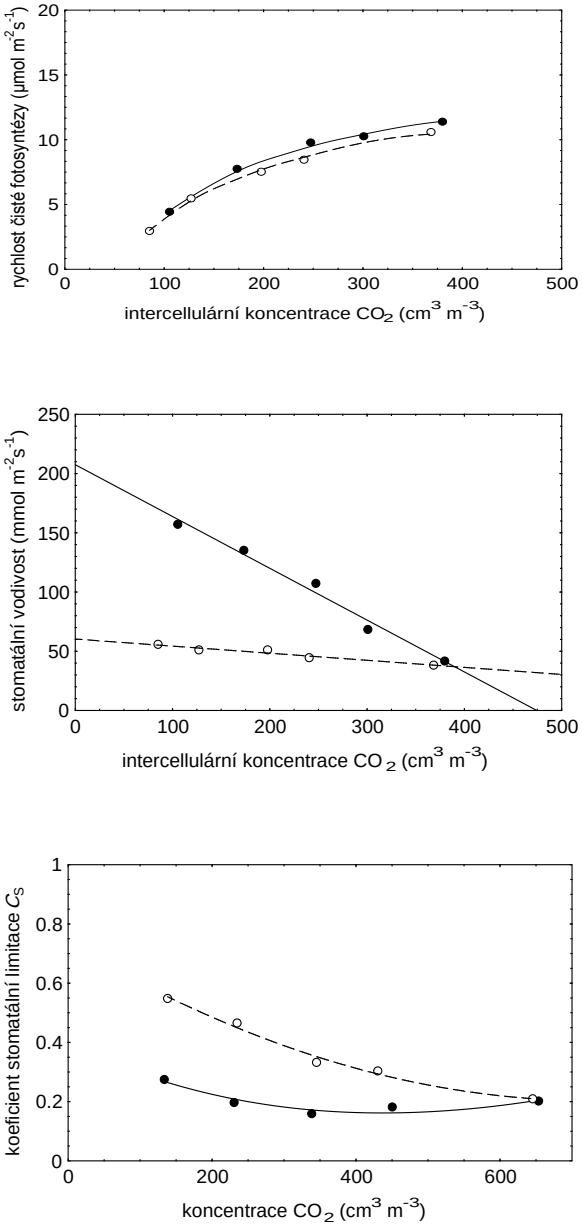
kontrola: -0.43 MPa, stres: -0.89 MPa



Obrázek 3.3.2.A.a: Rychlost čisté fotosyntézy (3.2.1.b) a stomatální vodivost pro vodní páru (3.2.1.a) v závislosti na intercelulární koncentraci CO_2. Spodní graf ukazuje koeficient stomatální limitace (3.2.2.a) v závislosti na koncentraci CO_2 v okolí listu. Plné kroužky a plná čára označují kontrolní variantu, prázdné kroužky a přerušovaná čára stresovanou variantu. V záhlaví sloupce je uveden vodní potenciál živného roztoku po měření.

Chlumecká 12-3

kontrola: -0.43 MPa, stres: -0.77 MPa



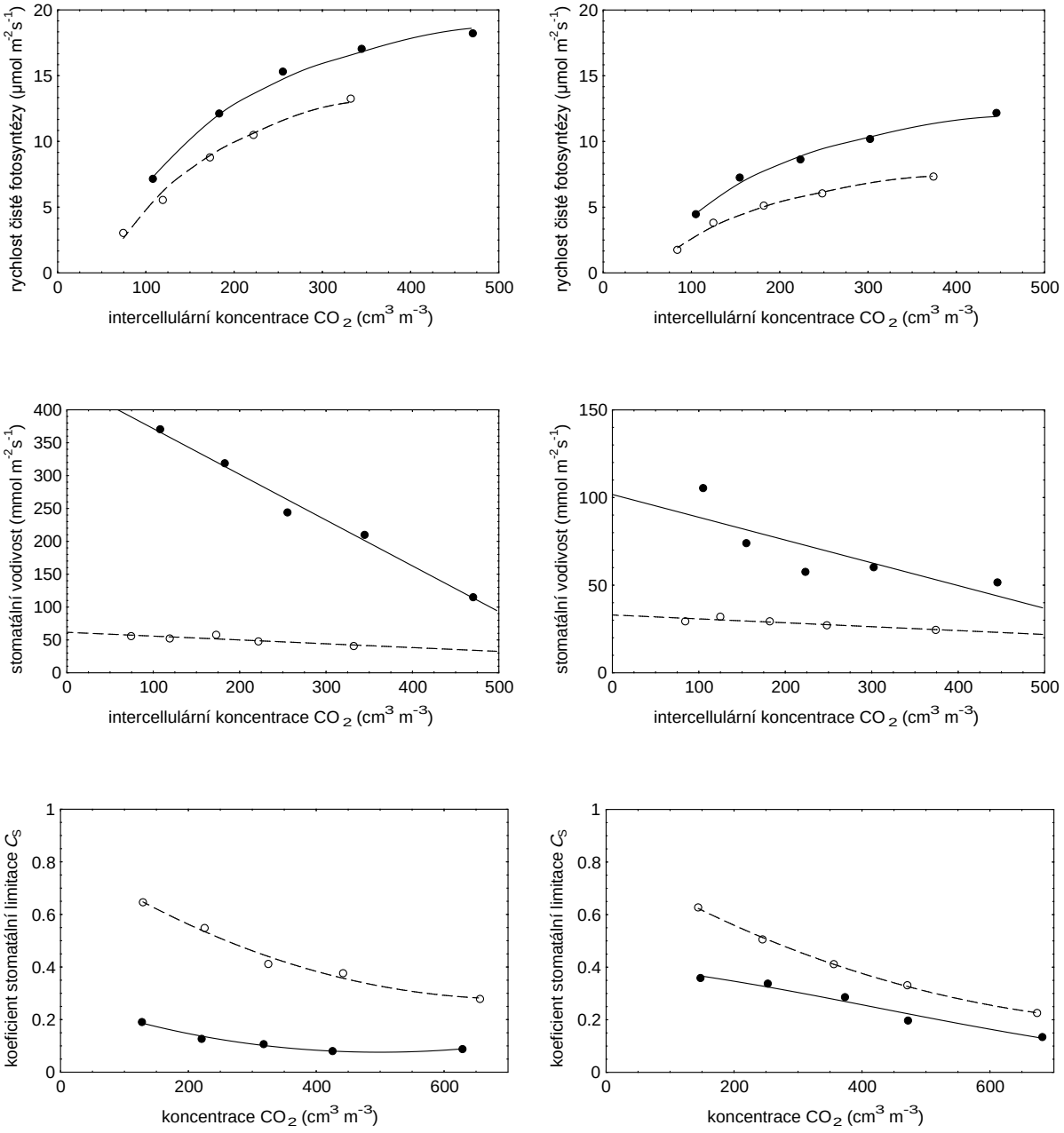
obrázek 3.3.2.a.b

Mexico 50/B21

kontrola: -0.23 MPa, stres: -1.04 MPa

Zdar

kontrola: -0.51 MPa, stres: -0.97 MPa



obrázek 3.3.2.a.c

Je vidět (tabulka 3.3.1.a) že ve většině případů byla závislost fotosyntézy na vnitřní koncentraci CO_2 vystižena hyperbolickým modelem velmi dobře i hodnoty temnotního dýchání vyšly až na jeden případ (Ch 2, kontrola) rozumně. Horší výsledky u stomatální

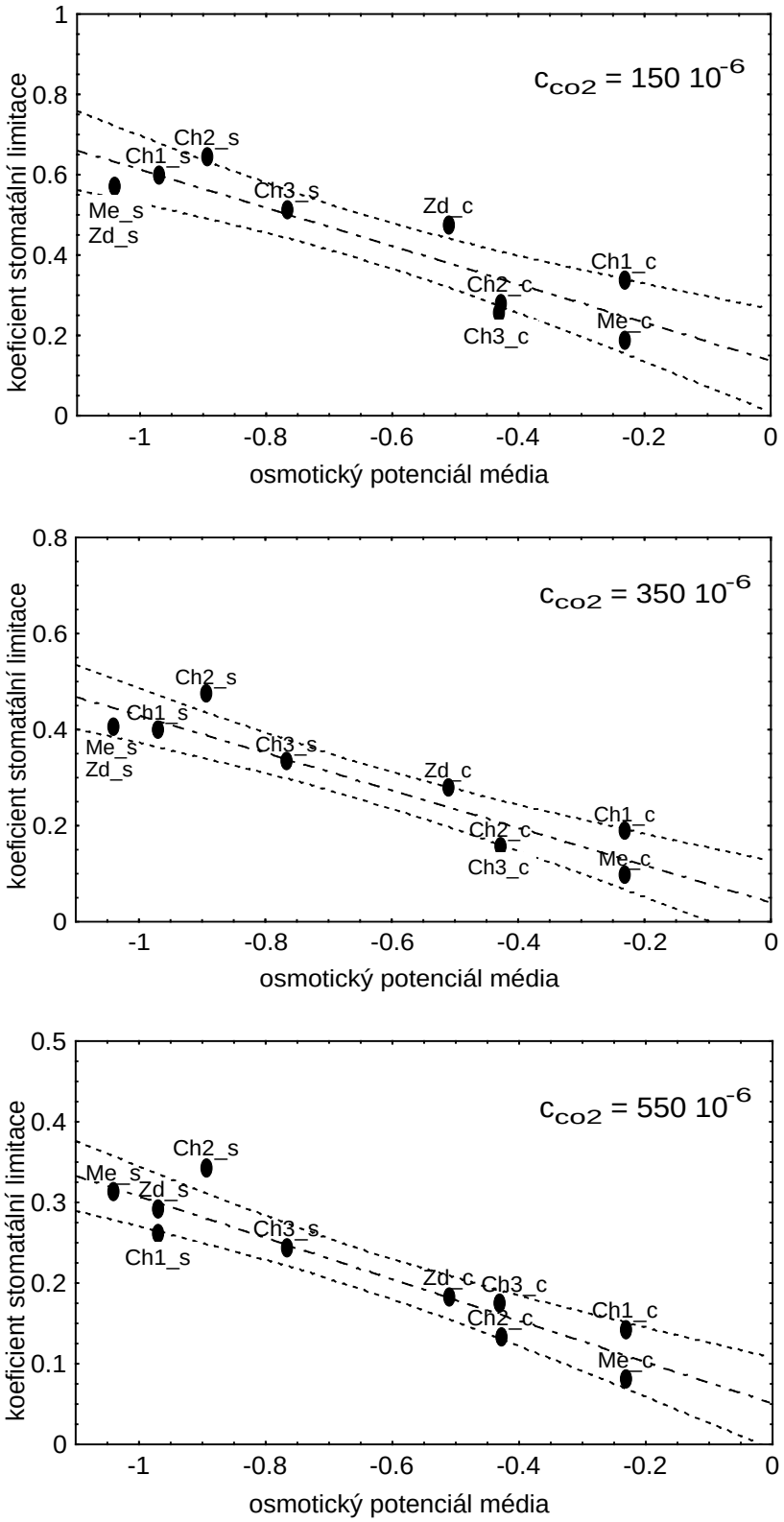
vodivosti vznikly spíše menší přesností měření než systematickou chybou danou sigmoidálním tvarem závislosti stomatální vodivosti na CO_2

.

	P_{max}	R_D	R^2	a	b	R^2
Ch1_c	20.7	1.1	0.98	-0.352	254	0.98
Ch1_s	16.9	1.1	0.99	-0.052	81	0.84
Ch2_c	22.6	0.1	0.96	-0.605	370	0.96
Ch2_s	23.9	1.1	0.99	-0.099	103	0.74
Ch3_c	17.7	1.3	0.99	-0.674	327	0.96
Ch3_s	16.2	1.1	0.997	-0.137	108	0.96
Me_c	26.6	1.7	0.997	-0.932	637	0.99
Me_s	21.5	1.8	0.99	-0.168	119	0.97
Zd_c	17.4	1.2	0.99	-0.116	126	0.82
Zd_s	11.7	1	0.997	-0.062	59	0.88

Tabulka 3.3.2.A Hodnoty regresních koeficientů a podíl variance vysvětlené modelem (R^2). Začátek zkratky znamená odrůdu Chlumeckou, Zdar nebo Mexico, c je kontrola a s stresovaná varianta.

Pro jednoduchý model výměny plynů (3.2.1.b) byly z regresních koeficientů a vztahu (3.2.2.b) vypočteny hodnoty stomatální limitace při různých koncentracích CO_2 v okolí listu. Výsledky jsou uvedeny formou grafu (obrázek 3.3.2.b) v závislosti na osmotickém potenciálu média.



Obrázek 3.3.2.B: Koeficient stomatální limitace v závislosti na osmotickém potenciálu živného roztoku u tří různých kultivarů ozimé pšenice (Chlumecká 12, Mexico 50-B21, Zdar). Přípona c značí kontrolu, s stres.

Korelační koeficienty mezi osmotickým potenciálem média a koeficienty stomatální limitace při 150, 350 a 550 μmol mol^{-1} mají hodnoty -0.91, -0.93 a -0.94 a jsou vysoce statisticky významné. Koeficient stomatální limitace tedy závisí lineárně na osmotickém potenciálu živného roztoku do -1 MPa při uvažovaných koncentracích. Směrnice regresní přímky klesá s rostoucí koncentraci CO_2. Není patrný vliv genotypu na hodnoty koeficientu limitace.

3.4 Diskuse

3.4.1 Vyvolání stresu pomocí PEG

Měřením dlouživého růstu během kultivace v roztoku obsahujícím PEG se ukázalo, že roztoky s vodním potenciálem kolem 0.5 MPa vyvolávají u klíčních rostlin pšenice takovou úroveň stresu, která se výrazně projeví na nejcitlivějších procesech, jako je dlouživý růst, ale ještě rostliny nepoškozuje. Větší relativní snížení růstu u zakrslé odrůdy Mexico 50/B21 může být projevem strategie avoidance úsporného typu (kapitola 0). Tento typ strategie je úspěšnější v podmínkách, kdy nelze ani s vynaložením větších metabolických nákladů zajistit další přísun vody, což asi platí pro oblast původu této odrůdy. Naopak v našich podmínkách je často možné i při suchu prorůstání kořenů do dosud vlhkého horizontu půdy, a silné snížení růstu by tedy bylo nevýhodné.

3.4.2 Interakce stresu nedostatkem vody a koncentrace CO_2

Při měření výměny plynů v laboratorních podmínkách se nedařilo opakovat měření při stejném potenciálu živného roztoku, protože vysoké hodnoty vodního potenciálu (kolem -0.2 MPa) jsou termočlánkovým psychrometrem obtížně měřitelné a nízké hodnoty vodního potenciálu se při zahušťování vlivem odpařování rychle mění díky kvadratické závislosti vodního potenciálu roztoků PEG na koncentraci. Proto byla stanovena hodnota potenciálu na konci měření, tedy v době, kdy dosahovala svého minima, podobně jako při měření vodního potenciálu živného roztoku při kultivaci na konci světelné periody před zavlažováním. Protože nebylo možné regulovat relativní vlhkost v okolí listu při měření, relativní vlhkost byla typicky kolem 40% ve stresované variantě a dosahovala 60-70% u kontroly při nízké koncentraci CO_2 a stomatální vodivost ve stresované variantě byla snížena i vlivem nižší relativní vlhkosti vzduchu.
Naměřené závislosti P_N na CO_2 byly dobře vystiženy vztahem (3.2.1.b) v souladu s předpokladem, že hlavní biochemickou limitací je v daných podmínkách regenerace ribulózabisfosfátu. Limitace sinkem by se bývala projevila výrazně plošším tvarem křivek. Podařilo se ověřit, že koeficient stomatální limitace je použitelný jako jednoduché měřítko poměru limitace fotosyntézy stomaty a biochemickými pochody v mezofylu. Praktická výhoda koeficientu stomatální limitace spočívá i v tom, že chyby ve stanovení listové plochy se projeví stejně ve výpočtu stomatální vodivosti a fotosyntézy a při výpočtu koeficientu stomatální limitace se vykrátí.
Stres nedostatkem vody až do hodnot kolem 1 MPa vodního potenciálu živného roztoku působil na rychlost asimilace CO_2 spíš zavírání stomat než zpomalením biochemických reakcí, což se projevilo i v lineárním růstu koeficientu stomatální limitace. Zvýšení koncentrace CO_2 vedlo ke snížení koeficientu stomatální limitace rovnoměrně v celém rozsahu měřených hodnot stresu.

4 Projevy stresu nedostatkem vody u genotypů ozimé pšenice

4.1 Úvod

4.1.1 Cíl práce

Cílem této části práce bylo zjistit pomocí měření výměny plynů v podmínkách blížících se přirozeným, zda se projevují geneticky podmíněné rozdíly v reakci na stres nedostatkem vody a ve strategii přizpůsobení k vodnímu stresu u kultivarů ozimé pšenice.
Strategii hospodaření vodou určit z podílu snížení kapacity metabolických drah a z podílu uzavření stomat na snížení fotosyntézy při suchu u různých genotypů.
Varianci výsledků způsobenou variabilitou prostředí odstranit pomocí statistických modelů závislosti sledovaných veličin na vnějších podmínkách.

4.2 Metoda

4.2.1 Vyhodnocení výsledků získaných měřením v uzavřeném systému pomocí LI-6000.

LI-6000 (Licor, USA) je přenosný přístroj pro měření fotosyntézy s infračerveným analyzátorem CO_2, vlhkostním čidlem Vaisala a termočlánky chromel-nikl. Je vybaven mikropočítačem pro sběr dat a výpočet rychlosti čisté fotosyntézy a stomatální vodivosti. Program implementovaný v LI-6000 se mi příliš neosvědčil, ukazoval záporné hodnoty intercelulární koncentrace CO_2, proto byla původní data (teplota listu a komory, ozářenost a koncentrace CO_2 v závislosti na čase) exportována do PC pomocí komunikačního seriového portu a vyhodnocena následujícím postupem, který umožnil zadat efektivní objem pro vodní páru nezávisle na efektivním objemu pro oxid uhličitý (programová realizace viz příloha C). Efektivní objemy pro vodní páru a pro CO_2 se díky různé absorbci na stěny liší od geometrického objemu systému i mezi sebou navzájem. Objem pro CO_2 byl stanoven měřením nárůstu koncentrace po přidání známého objemu (0.25 ml) CO_2 injekční stříkačkou. Objem pro vodní páru byl vypočítán ze zvýšení relativní vlhkosti po odpaření určitého množství vody z filtračního papíru. Vyšlo 650 ml pro vodní páru a 385 ml pro oxid uhličitý, geometrický objem systému udávaný výrobcem je 320 ml.
Koncentrace oxidu uhličitého (c^c) při měření rychlosti čisté fotosyntézy (P_N) se chová podle diferenciální rovnice

$$V^c \frac{dc^c}{dt} = -S \cdot P_N \qquad (4.2.1.A)$$

kde V^C je efektivní objem systému pro CO_2 a S je listová plocha. Řešením této rovnice, za předpokladu že P_N nezávisí na c^c, je lineární funkce času (t)

$$c^c = c_0^c - \frac{P_N \cdot S}{V^c} \cdot t \qquad (4.2.1.B)$$

Uvedený předpoklad o nezávislosti je splněn pro krátkodobá měření, během nichž koncentrace CO_2 příliš nepoklesne. Rychlost čisté fotosyntézy lze vypočítat ze směrnice lineární regresní funkce koncentrace CO_2 na čase.
Parciální tlak vodní páry (p^w) při měření transpirace (E) se chová podle diferenciální rovnice

$$\frac{V^w}{RT}\frac{dp^w}{dt} = S \cdot E \qquad (4.2.1.C)$$

kde V^w je efektivní objem systému pro vodní páru a S je listová plocha. Vyjádříme li transpiraci pomocí stomatální vodivosti pro vodní páru (g_s^w) a tlaku vodní páry v intercelulárách (p_L^w), dostaneme

$$\frac{V^w}{RT}\frac{dp^w}{dt} = S \cdot g_S^w \cdot \left(p_L^w - p^w\right) \Big/ p_{atm} \qquad (4.2.1.D)$$

Řešením této rovnice je exponenciální funkce času (t)

$$p^w = p_L^w \cdot \left(1 - e^{-t/t_c}\right) \qquad (4.2.1.E)$$

kde t_c je časová konstanta je daná výrazem

$$t_c = \frac{p_{atm} \cdot V^w}{RTS \cdot g_S^w} \qquad (4.2.1.F)$$

p_i^w lze vypočítat z teploty listu jako koncentraci nasycené páry, $1/t_c$ jako směrnici regresní přímky ($p^w - p_L^w$), linearizované logaritmováním, na čase. Z hodnoty t_c lze vypočítat g_s^w.

4.2.2 Kultivace

Z polních pokusů byly odebrány začátkem března jarovizované rostliny odrůd Mironovská 808, Karlik, Viginta, Chlumecká 12 a Vala. Dvakrát po deseti rostlinách od každé odrůdy bylo zasazeno do půdy v desetilitrových nádobách. Kultivace probíhala ve skleníku s hrubou regulací teploty (teplota 20 až 35 °C). Nádoby byly zavlažovány automatickým závlahovým zařízením (Gardena, Německo) s čidly upravenými na zavlažování při -0.01 MPa matričního potenciálu půdy. Po ukončení růstu praporcového listu byl na jednu nádobu od každé odrůdy aplikován stres nedostatkem vody úpravou čidel na -0.06 MPa matričního potenciálu půdy.

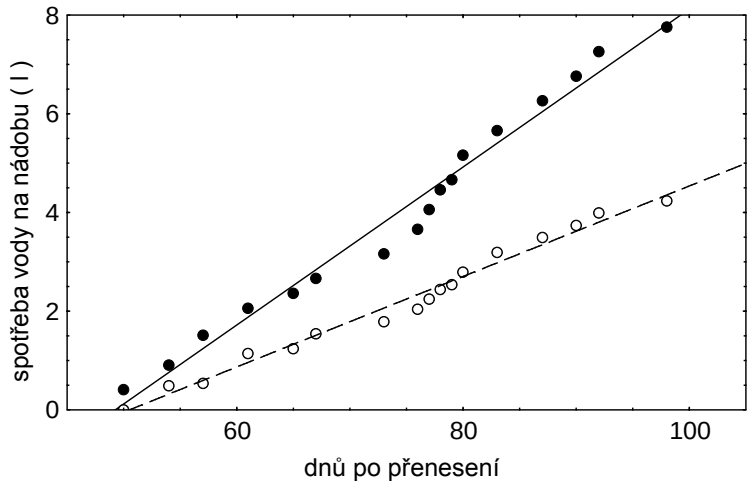
4.3 Výsledky

Při sledování ontogeneze (tabulka 4.3.a) se jako ranější projevily odrůdy Karlik, Viginta a Vala, odrůda Chlumecká byla výrazně opožděna.

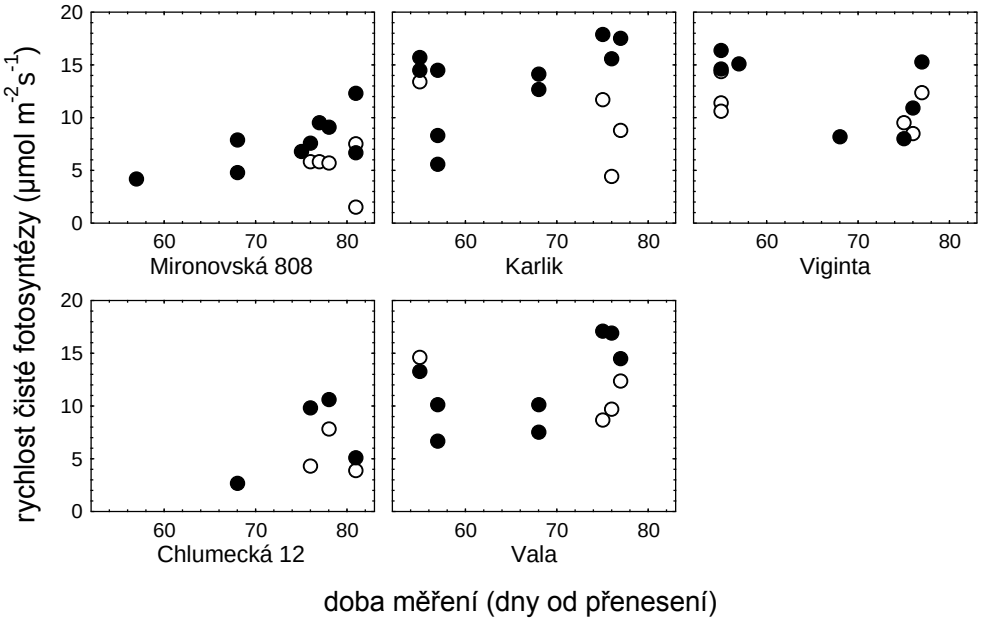
	kontrola				stres			
dnů po přenesení:	49	56	63	70	49	56	63	70
Mironovská 808	41	45	65	69			61	71
Karlik	59	60	69	75		60	69	73
Viginta	61	65	69	75		65	69	75
Chlumecká 12	39	40	43	59			43	52
Vala	40	60	69	75		60	69	75

Tabulka 4.3.A: Ontogeneze rostlin v nádobových pokusech hodnocená podle Zadoksovy stupnice (Nátrová, 1992), 00 - klíčení, 10 - vzcházení, 20 - odnožování, 30 - sloupkování, 40 - naduření listové pochvy, 50 - metání, 6 - kvetení, 7 - mléčná zralost, 80 - vosková zralost, 90 - zrání. Časové údaje jsou ve dnech po přenesení z pole do skleníku.

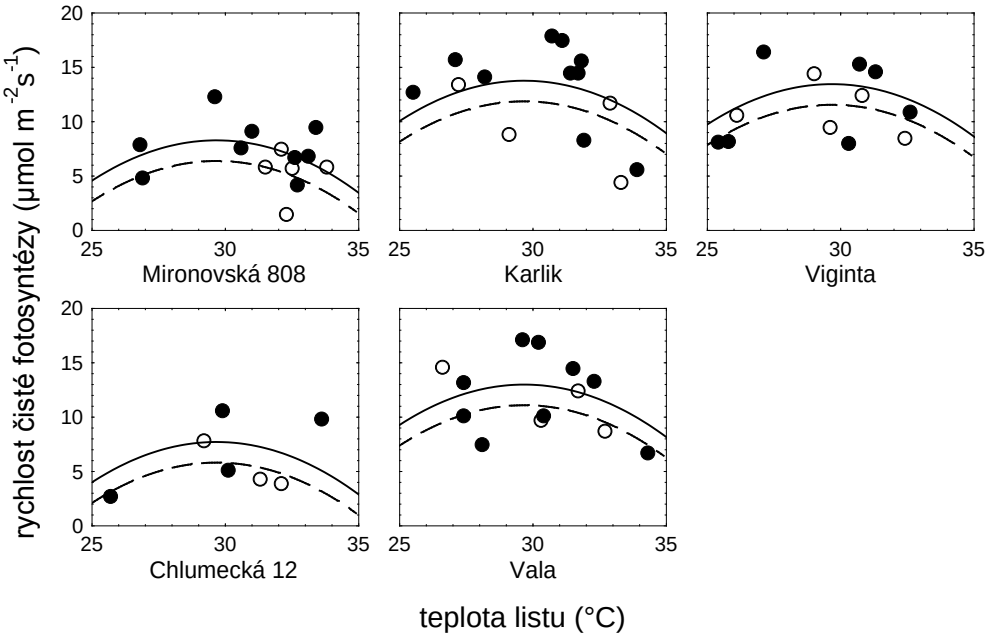
Spotřeba vody, měřená pomocí kontrolní trysky, byla od 50. dne po přenesení z pole poměrně stabilní (obrázek 4.2.2.a). Průměrná spotřeba vody činila 158.4 a 86.5 ml na nádobu za den. Měření rychlosti fotosyntézy a transpirace otevřeným gazometrickým systémem LI6000 probíhala asi od 50. do 80. dne od přenesení rostlin z pole. Měření probíhalo ve skleníku za přirozeného osvětlení a teplota při měření se pohybovala od 25 do 35 °C, což se projevilo ve velké variabilitě měření (obrázek 4.2.2.b).



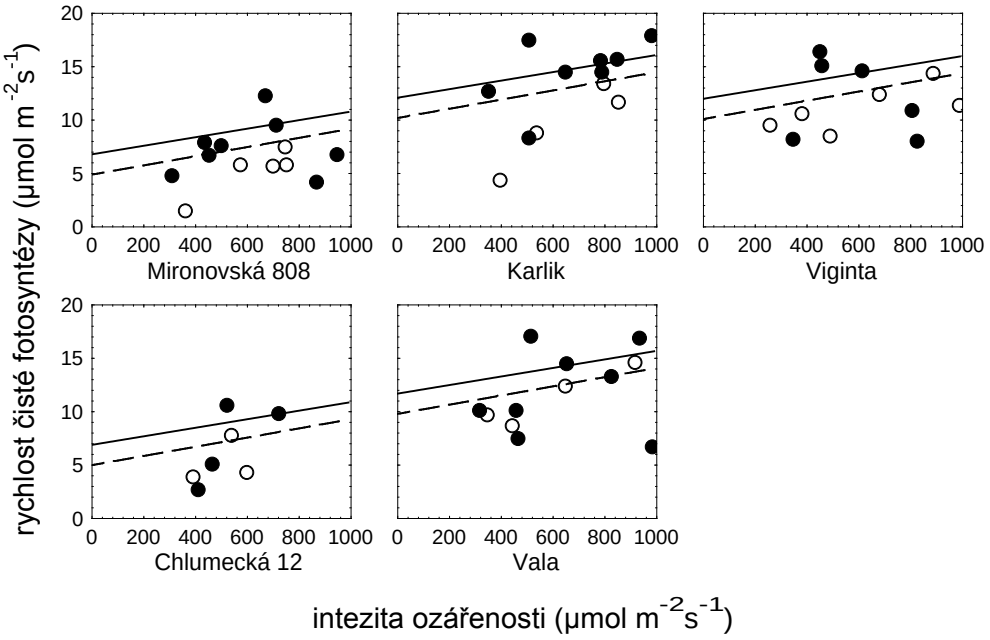
Obrázek 4.2.2.A: Zálivka vztažená na 10 rostlin, stejná pro všechny odrůdy. Kontrola je vyznačena plnou čarou, stresovaná varianta přerušovanou čarou.



Obrázek 4.2.2.B: Hodnoty rychlosti čisté fotosyntézy naměřené v proměnlivých podmínkách. Kroužky - stresovaná varianta, kolečka - kontrola.



Obrázek 4.2.2.C: Vliv teploty na hodnotu rychlosti čisté fotosyntézy, křivky byly získány lineární regresí rychlosti fotosyntézy na teplotě a druhé mocnině teploty s uvážením vlivu varianty a genotypu. Kroužky - stresovaná varianta, kolečka - kontrola.



Obrázek 4.2.2.D: Vliv světelné intenzity na hodnotu rychlosti čisté fotosyntézy, křivky byly získány lineární regresí rychlosti fotosyntézy na světle s uvážením vlivu varianty a genotypu. Kroužky - stresovaná varianta, kolečka - kontrola.

Aby bylo možné stanovit vliv genotypu na rychlost čisté fotosyntézy, bylo nejprve nutné odstranit zřejmý vliv teploty (obrázek 4.2.2.c) a intenzity světla (obrázek 4.2.2.d) pomocí regresní analýzy.
Lineární regrese hodnot čisté rychlosti fotosyntézy současně na světle, teplotě a druhé mocnině teploty, intenzitě ozářenosti, variantě a odrůdě vysvětlila R^2=0.62 variance hodnot a prokázala významnou závislost (4.2.2.a) naměřených hodnot na světle a teplotě.

$$P_N = \alpha \cdot I + \beta \cdot t + \gamma \cdot (t-30)^2 + \delta \cdot varianta + \sigma \cdot x_1 + \varsigma \cdot x_2 + \tau \cdot x_4 + \upsilon \cdot x_5 + \varepsilon \qquad (4.2.2.A)$$

ε je náhodná chyba měření, ostatní řecká písmena znamenají regresní koeficienty..

	koeficient	p
konstanta	-139.3	0.07
I	0.00667	0.001
t	-0.368	0.03
$(t-30)^2$	-0.192	0.001
varianta	1.587	0.04
x_1	-5.1	0.00001
x_2	0.3	0.8
x_3	0	
x_4	-5.3	0.0001
x_5	-0.8	0.5

Tabulka 4.3.B: Hodnoty koeficientů lineární regrese rychlosti čisté fotosyntézy na světle, teplotě, pokusné variantě a odrůdě se statistickou významností. Vliv varianty a odrůdy je zahrnut pomocí proměnných „varianta“ a x_1-x_5.

Na základě výsledků regrese jsme se rozhodli použít pro hodnocení meziodrůdových rozdílů analýzu kovariance dvojného třídění s pomocnými proměnnými intenzitou ozářenosti, teplotou a její druhou mocninou.

	n efekt	MS efekt	n chyba	MS chyba	F	p
Odrůda	4	76.5	50	7.6	9.9	.000006
Varianta	1	32.3	„	„	4.5	.04
Interakce	4	5.2	„	„	.7	.6

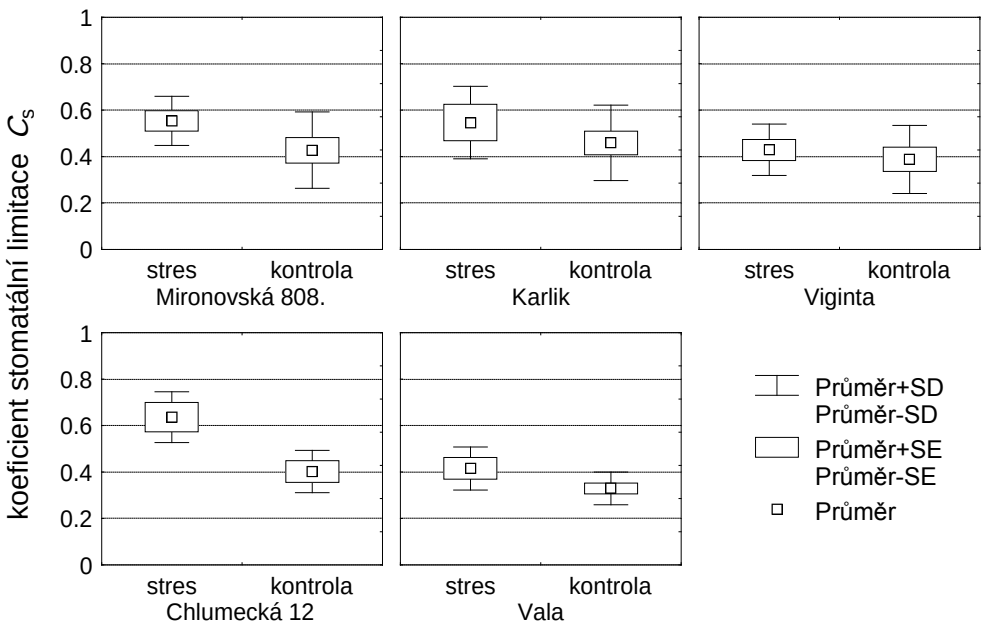
Tabulka 4.3.C: Analýza kovariance rychlosti čisté fotosyntézy s pomocnými proměnnými intenzitou ozářenosti, teplotou a druhou mocninou teploty.

Vliv genotypu se projevil velmi výrazně, vliv ošetření byl méně patrný a interakce vyšla nevýznamná. Vyšší rychlost fotosyntézy byla naměřena u ranných odrůd.

průměrná rychlost čisté fotosyntézy (µmol $m^{-2}s^{-1}$)			
Mironovská 808	6.5		
Karlik	11.6	Stres	8.5
Viginta	11.6	Kontrola	10.5
Chlumecká 12	6.2		
Vala	11.8		

Tabulka 4.3.D: Průměrné hodnoty rychlosti čisté fotosyntézy (µmol $m^{-2}s^{-1}$) u 5 odrůd ozimé pšenice ve 2 pokusných variantách.

Koeficient stomatální limitace byl vypočten z naměřené rychlosti fotosyntézy a stomatální vodivosti pomocí formulí z předchozího oddílu práce.



Obrázek 4.2.2.E: Hodnoty koeficientu stomatální limitace u 5 odrůd ozimé pšenice ve dvou pokusných variantách. Vyznačen je průměr, standardní chyba průměru a směrodatná odchylka.

Rozdíly mezi odrůdami a variantami v hodnotě koeficientu stomatální limitace byly hodnoceny analýzou kovariance dvojného třídění s intenzitou ozářenosti, teplotou a její druhou mocninou jako proměnnými.

	n efekt	MS efekt	n chyba	MS chyba	F	p
Odrůda	4	0.038	50	0.017	2.2	0.08
Varianta	1	0.139	„	„	8.1	0.006
Interakce	4	0.011	„	„	0.7	.6

Tabulka 4.3.E: Analýza kovariance koeficientu stomatální limitace s pomocnými proměnnými intenzitou ozářenosti, teplotou a druhou mocninou teploty.

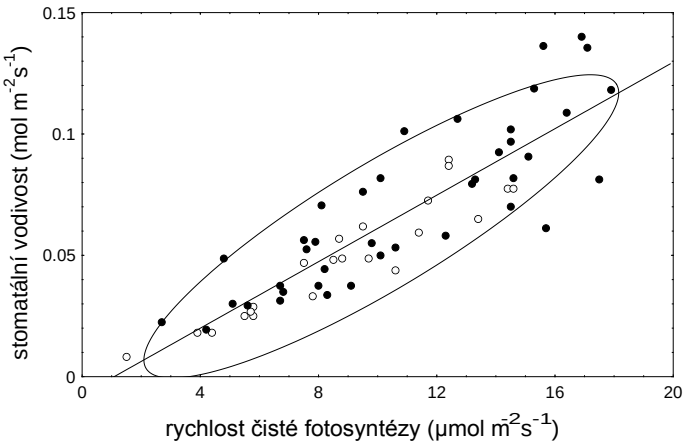
Významný byl pouze vliv ošetření. Vliv genotypu se na hodnotě stomatální limitace neprojevil, rovněž interakce vyšla nevýznamná.

Mironov.	0.49		
Karlik	0.50	Stres	0.52
Viginta	0.41	Kontrola	0.40
Chlumec.	0.52		
Vala	0.37		

Tabulka 4.3.F Analýza kovariance koeficientu stomatální limitace s pomocnými proměnnými intenzitou ozářenosti, teplotou a druhou mocninou teploty.

4.4 Diskuse

Velká část variability v měření výměny plynů u rostlin pěstovaných ve skleníku byla odstraněna uvážením monotónní závislosti rychlosti fotoszntézy na světle a jednovrcholové závislosti na teplotě. Rozdíly v rychlosti čisté fotosyntézy se projevily výrazněji mezi odrůdami než mezi stresovanou variantou a kontrolou. Přestože byla snaha vyvolat stres ve stejném stadiu ontogeneze rostlin, na začátku kvetení, ranné odrůdy Karlik, Viginta a Vala měly výrazně vyšší rychlost fotosyntézy než pozdnější Mironovská a Chlumecká. Lze to snad vysvětlit interakcí s vysokou teplotou během citlivé fáze kvetení u pozdnějších kultivarů. Meziodrůdové rozdíly v koeficientu stomatální limitace, které by naznačovaly rozdíly ve strategii reakce odrůd na sucho, se neprojevily.
Hodnoty rychlosti fotosyntézy a stomatální vodivosti naměřené v proměnných podmínkách v obou variantách a u všech odrůd byly silně korelovány (obrázek 4.2.2.a, korelační koeficient 0.88).



Obrázek 4.2.2.A: Vztah mezi stomatální vodivostí a rychlostí čisté fotosyntézy naměřené u 5 odrůd ozimé pšenice ve 2 variantách zavlažování v proměnlivých podmínkách.

Tato lineární závislost odpovídá formuli (4.2.2.a) (Ball a kol., 1987), která slouží často pro modelování stomatální vodivosti v závislosti na podmínkách prostředí . Položíme g_{s0} rovno 0, jelikož má zpravidla malou hodnotu.

$$g_S = \frac{\alpha \cdot RH \cdot P_N}{c^C} + g_{s0} \qquad (4.2.2.A)$$

RH je relativní vlhkost (%) a c^c koncentrace CO_2 v okolí listu. Zmíněná formule umožňuje porovnání hodnot koeficientu stomatální limitace C_S naměřených v řízených podmínkách a uvedených v předchozí části práce a hodnot ze skleníku. V laboratorních měřeních vycházelo C_S průměrně 0.18 pro kontrolu a 0.41 pro stresovanou variantu při koncentraci CO_2 350 µmol mol^{-1}, ve skleníku při srovnatelné koncentraci CO_2 vycházely výrazně vyšší hodnoty 0.4 a 0.52. Rozdíl byl způsoben zejména nižší stomatální vodivost způsobenou menší relativní vlhkostí vzduchu (20%) ve skleníku. Kdyby byla relativní vlhkost vzduchu 50% a tedy podle výše uvedené formule by stomatální vodivost byla dvaapůlkrát vyšší, vyšlo by přibližně 0.22 pro kontrolu a 0.31 pro stresovanou variantu. Úroveň stresu ve skleníku vyvolaná -0.06 MPa matričního potenciálu půdy tedy měla tedy na výměnu plynů spíše menší účinek než -1MPa vodního potenciálu roztoku, naopak než by vyplývalo z přímého srovnání koeficientů stomatální limitace.

5 Hodnocení mrazového poškození rostlin pomocí nelineární regrese logistickou funkcí.

5.1 Úvod

Pokud lze úroveň stresu kvantitativně popsat jednou proměnnou, jako například teplotou mrznutí u stresu mrazem, dostáváme esovitou závislost reakce na intenzitě stresové zátěže (Levitt, 1980). Odolnost rostliny lze charakterizovat intenzitou stresu, při které se dosáhne 50% poškození. Příkladem je závislost poškození rostliny na teplotě mrazu a z ní odvozená kritická teplota CT_{50}..
Ve způsobech výpočtu CT_{50} používaných dříve, jako je probitová nebo logitová analýza, bylo nutné znát hodnotu reakce při minimální a maximální zátěži a naměřená data převést do měřítka 0-100% (Zhu a Liu, 1987). Přitom je možné hodnoty minimální a maximální reakce získat spolu s hodnotou CT_{50} přímo nelineární regresí naměřených dat.
Cílem této práce bylo odvodit metodu pro výpočet CT_{50} nelineární regresí závislosti reakce rostliny na stres, a metodu pro statistické porovnání takto získaných hodnot a obě metody implementovat v uživatelsky přátelských programech pro osobní počítač.

5.2 Metoda

Vyjádření 4-parametrové logistické funkce je ve vzorci (5.2.a).

$$I(T) = I_{min} + \frac{(I_{max} - I_{min})}{1 + e^{-4 \cdot RIR \cdot (T - CT_{50})}} \qquad (5.2.A)$$

I_{min} je reakce rostliny při minimálním, I_{max} při maximálním stresovém zatížení. RIR, relativní rychlost poškození, je směrnice závislosti poškození na síle stresu.
Pro výpočet nelineární regrese byl použit Newtonův-Marquardtův algoritmus s využitím výpočtu prvních a druhých derivací ztrátové funkce Φ, (5.2.b).

$$\Phi(I_{min}, I_{max}, CT_{50}, RIR) = \sum_{n} \left(I_n - I(I_{min}, I_{max}, CT_{50}, RIR, T_n)\right)^2 \qquad (5.2.B)$$

Výsledkem je kromě odhadů parametrů i odhad kovarianční matice parametrů C. Ta může být použita pro výpočet šířky konfidenčního pásu při teplotě T, h(T) viz (5.2.c) (Schaff a kol., 1987).

$$h(T) = t_{\alpha,n-4} \cdot g(T)^T \cdot C \cdot g(T) \qquad (5.2.C)$$

$$g(T) = \left[\frac{\partial I}{\partial I_{min}}(T), \frac{\partial I}{\partial I_{max}}(T), \frac{\partial I}{\partial CT_{50}}(T), \frac{\partial I}{\partial RIR}(T) \right]^T$$

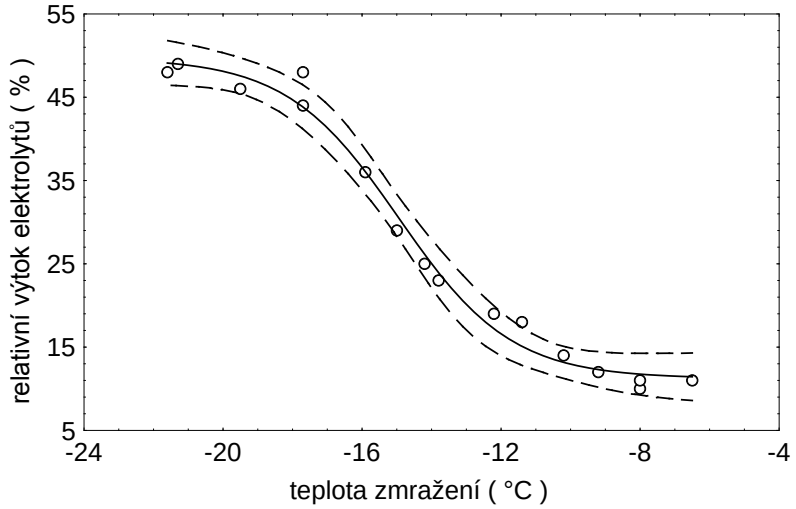
Porovnávání odolností je založeno na Scheffeho testu rozdílnosti skupiny hodnot CT_{50} a následném porovnání dvojic hodnot Studentovým testem. Oba testy používají hodnoty standardních chyb (5.2.d) a počet stupňů volnosti.

$$std(LT_{50}) = \frac{\sqrt{c_{44}}}{n - 4} \qquad (5.2.D)$$

Výsledkem porovnání jsou uspořádané hodnoty LT_{50} s vyznačením homogenních skupin. Příslušné programy byly napsány v Turbo Pascalu s využitím knihovny Turbo Profesional.

5.3 Výsledky

Příklady použití jsou uvedeny v přiložené práci Janáček a Prášil, 1991, odkud je i obrázek 5.3.a. Příkladem použití obecného 4 parametrového modelu je regrese dat výtoku elektrolytů po mrazovém poškození rostlin. Hodnoty I_{min} a I_{max} vyjdou u výrazně esovitých dat fitováním a není je tedy nutno stanovovat zvlášť, jako je tomu při alternativních postupech.
Při nelineární regresi lze kterýkoliv ze 4 parametrů metody zadat jako konstantní (pak roste počet stupňů volnosti). Toho lze využít při hodnocení poškození pomocí rychlosti růstu, kdy I_{max}=0, vypočtená hodnota I_{min} udává rychlost růstu nepoškozených rostlin. Při hodnocení životnosti je předem známo, že I_{min}=100%, I_{max}=0%.
Porovnáním odolnosti pomocí CT_{50} v uvedených charakteristikách vyšly růst a výtok elektrolytů jako citlivější k mrazu než životnost.



Obrázek 5.3.A: Esovitá závislost výtoku elektrolytů vztaženému ke kontrole a vzorku upravenému vařením. Minimální a maximální hodnota výtoku elektrolytů závisí na konkrétních experimentálních podmínkách, jako je velikost vzorku nebo délka měření (viz Prášil a Zámečník, 1990).

5.4 Diskuse

Popsaná metoda se s úspěchem používá k hodnocení mrazového poškození na pracovišti VÚRV Praha. Program LT50 pro výpočet parametrů a program LV50 pro srovnávání variant jsou volně dostupné v české i anglické verzi. V současné době je už možno použít k snadnému výpočtu nelineární regrese i mnoha komerčních programů, například Sigmaplot, obvykle je ale úspěch podmíněn dobrým počátečním odhadem parametrů, který se u programu LT50 provádí automaticky.

6 Třídění odrůd obilovin podle zimovzdornosti

6.1 Úvod

V případě stresu, který není možné charakterizovat jednou proměnnou, lze hodnotit odolnost rostlin různých druhů vzájemným srovnáním. Příkladem je souhrn stresů působících při přezimování.
Na přezimování rostlin působí řada nepříznivých faktorů, kromě přímého působení mrazu jsou to například mrazové zdvihy půdy a na jaře zaplavení vodou. Rostliny se mohou adaptovat nejen zvýšením mrazuvzdornosti, ale i celkovým habitem, rozvojem kořenové soustavy a přizpůsobením fenologického vývoje. Zimy se mohou lišit podle složení stresových faktorů a různé genotypy rostlin se mohou přizpůsobovat různým způsobem. Naštěstí interakce mezi typem zimy a způsobem adaptace odrůdy není v rámci jednoho druhu obilovin významná a tedy se pořadí odrůd podle přezimování v různých letech příliš neliší (Prášil a kol., 1989).
Uvedu metodu kvantitativního vyhodnocení zimovzdornosti sortimentu odrůd ozimé pšenice a ozimého ječmene na základě dlouhodobých pokusů, prováděných na oddělení fyziologie rostlin ve VÚRV v Praze Ruzyni.

6.2 Metoda

Pokusné rostliny byly vysévány ve dvou až třech termínech do dřevěných bedýnek naplněných prstí a umístěných jednak na zemi, jednak na vyvýšeném parapetu. V každé variantě bylo sledováno kolem 60 rostlin. Sortiment odrůd byl průběžně mezi ročníky obměňován. Na jaře byl hodnocen zlomek přežití.
Hodnocení zimovzdornosti odrůd vychází ze statistického modelu přezimování, v němž je počet živých rostlin náhodná veličina s binomickým rozdělením a pravděpodobnost přežití je logisticky závislá na součtu faktoru vnějších podmínek a faktoru odolnosti odrůdy.
Logistická funkce (6.2.a)

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-\pi x/\sqrt{3}}} \qquad (6.2.A)$$

je použita proto, že dává jednoduché odvozené vztahy a snadno se počítá. Logistická funkce je řešením diferenciální rovnice (6.2.b), kterou lze interpretovat tak, že dy/dx, rychlost růstu pravděpodobnosti přežití y, je úměrná jednak aktuální hodnotě pravděpodobnosti přežití y, tedy množství živých rostlin, jednak hodnotě vyzimování (1-y), tedy jistému samozřejmému ukazateli síly stresu.

$$\frac{dy}{dx} = \frac{\pi}{\sqrt{3}} \cdot y \cdot (1 - y) \qquad (6.2.B)$$

Základní statistický model je ve vzorečku (6.2.c)

$$y_{ij} = f(\mu + a_i + b_j + \varepsilon_{ij}) + \xi_{ij}$$

$$\sum_i a_i = \sum_j b_j = 0 \qquad (6.2.C)$$

kde index i odpovídá odrůdě, index j vnějším podmínkám, y_{ij} je poměrné přežití, a_i koeficient odolnosti odrůdy, b_j koeficient vnějších podmínek, εij experimentální chyba a ξ_{ij} chyba odečtu, daná vlastnostmi binomického rozdělení. Interakce odrůd s vnějšími podmínkami mohou být zahrnuty do experimentální chyby, jelikož je známo, že v případě přezimování nehrají vážnější roli. Logitovou transformací (6.2.d) základního modelu

$$z_{ij} = -\frac{\sqrt{3}}{\pi} \cdot \ln\left(\frac{1}{y_{ij}} - 1\right) \qquad (6.2.D)$$

dospíváme k lineárnímu modelu dvojného třídění (6.2.e), který budeme řešit za zjednodušujících předpokladů, že ε_{ij} a δ_{ij} jsou vesměs nezávislé, normálně rozdělené s nulovou střední hodnotou. N značí počet pokusných rostlin jedné odrůdy v každé variantě.

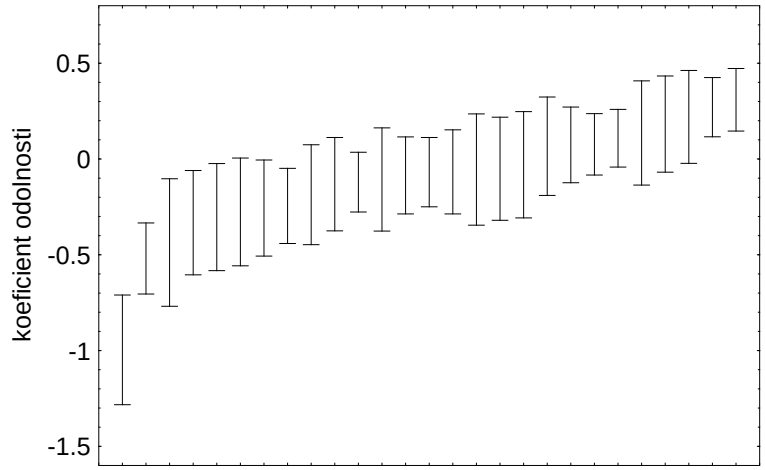
$$z_{ij} = \mu + a_i + b_j + \varepsilon_{ij} + \delta_{ij}$$

$$\mathrm{var}\left(\varepsilon_{ij}\right) = \sigma^2, \quad \mathrm{var}\left(\delta_{ij}\right) = \frac{3}{\pi^2 \cdot N \cdot y_{ij} \cdot \left(1 - y_{ij}\right)} \qquad (6.2.E)$$

Pro vyřešení tohoto modelu je třeba stanovit hodnoty koeficientů odrůd a_i, koeficientů vnějších podmínek b_j a rozptylu σ^2. Pro řešení bylo použito iterační metody pro řešení soustavy normálních rovnic dvojného třídění s vahami a nevyváženými daty.
Metoda byla realizována programem v PASCALu na osobním počítači. Pro reálná data a počet rostlin 60 nenastávaly problémy s konvergencí, koeficienty odolnosti a podmínek vysvětlovaly typicky 90% rozptylu transformovaných hodnot přežití, suma čtverců chyb daných odečtem tvořila asi třetinu reziduální sumy čtverců.

6.3 Výsledky

Pro počet rostlin 60 nenastávají problémy s konvergencí, koeficienty odolnosti a podmínek vysvětlují kolem 90% rozptylu transformovaných hodnot přežití, suma čtverců chyb daných odečtem tvoří asi třetinu reziduální sumy čtverců.



Obrázek 6.3.A: Koeficienty odolnosti odrůd a novošlechtění ozimého ječmene k vyzimování. U každé odrůdy byla stanovena životnost 60 rostlin v alespoň 10 kombinacích vnějších podmínek, zobrazeny jsou konfidenční intervaly na hladině významnosti 5%. Vypočteno z údajů poskytnutých Dr. Prášilem z VÚRV Praha.

Příklad použití uvedené metody je uveden na obrázku (obrázek 6.3.a) a v přiložené práci Prášil a kol. (1994), věnované stanovení zimovzdornosti sortimentu historických a současných českých a slovenských odrůd ozimé pšenice.

6.4 Diskuse

Úspěšné použití metody podobné analýze variance dvojného třídění bez interakcí pro třídění genotypů obilovin na základě údajů o přezimování potvrzuje, že interakce mezi tuhostí zimy a odolností genotypů je zanedbatelná.
Metodu je možné použít pro srovnání zimovzdornosti genotypů obilovin i v případě, že se jejich sortiment značně obměňuje. Metoda není výpočetně náročná, program pro osobní počítač pracuje dobře se stovkami odrůd v desítkách pokusů.

7 Stanovení délky a charakterizace větvení kořenů

7.1 Úvod

Délka kořenového systému rostliny je citlivý indikátor půdních stresů, jako je například aluminiová toxicita při nízkém pH půdy (Foy, 1983) .
Protože přímé měření délky kořenového systému měřítkem je obvykle příliš časově náročné, používá se metoda založená na počítání průsečíků s testovacím systémem čar (Newman, 1966). Použijeme-li rovnoběžné přímky s roztečí d a spočteme-li n průsečíků, je odhad celkové délky L dán formulí (7.1.a).

$$L = \frac{\pi \cdot d}{2} \cdot n \qquad (7.1.A)$$

Další zrychlení přináší použití počítačové analýzy obrazu (Harris a Campbell, 1989). Oproti počítání průsečíků je o jednu až dvě třetiny rychlejší (Farrell a kol., 1993). Současně je možné automaticky počítat kořenové špičky (Zoon a van Tierderen, 1990) a tak charakterizovat větvení kořenů.
Cílem této práce bylo vyvinout metodu hodnocení účinků stresu nízkým pH a aluminiovou toxicitou pomocí počítačové analýzy obrazu.

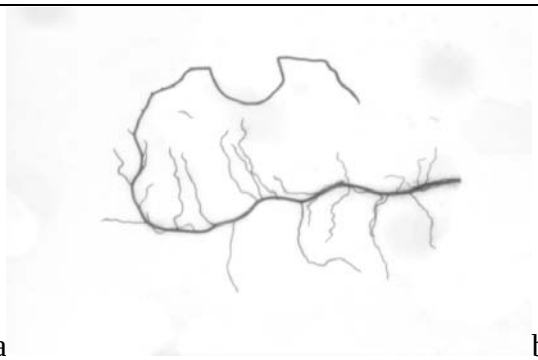
7.2 Metoda

7.2.1 Počítačová analýza obrazu

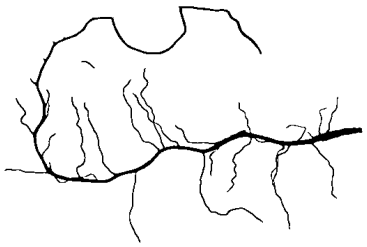
Obraz v digitální podobě je složen z malých obdélníkových políček stejné barvy, neboli pixelů. Obrazy rozlišujeme podle počtu možných hodnot pixelu. Binární obrazy mohou mít pouze dvě hodnoty. Snímaný obraz mívá obvykle od 2^8=256 do 2^{24} =16777216 hodnot.
Prvním krokem počítačové analýzy obrazu je zpravidla zvýraznění neboli předzpracování sejmutého obrazu. Následuje segmentace měřených objektů, kterou je nejsnadnější realizovat jako převedení obrazu do binárního tvaru, při němž nastavení hodnoty pixelu na 1 znamená příslušnost pixelu k měřenému objektu. Snadným způsobem segmentace je nastavení pixelu binárního obrazu podle barevné hodnoty předzpracovaného obrazu neboli prahování. Objekty jsou pak identifikovány jako souvislé plochy nastavených pixelů. Měření ploch se děje počítáním nastavených pixelů a délka obvodu se odvodí z počtu průsečíků obvodu se všemi horizontálními, vertikálními a diagonálními řadami pixelů.

7.2.2 Realizace metody

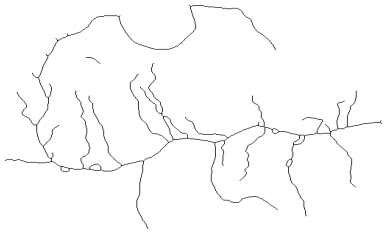
Pro hodnocení délky kořenů byl použit systém počítačové analýzy obrazu LUCIA (Laboratory Imaging, ČR) vybavený televizní CCD kamerou (COHU, USA).
Před snímáním byly kořeny asi týden starých rostlin ozimé pšenice, odrůdy Zdar a Atlas, obarveny roztokem metylové violeti a rozprostřeny na Petriho misce. Při snímání byly misky umístěny na prosvětlovacím zařízení.



a



b



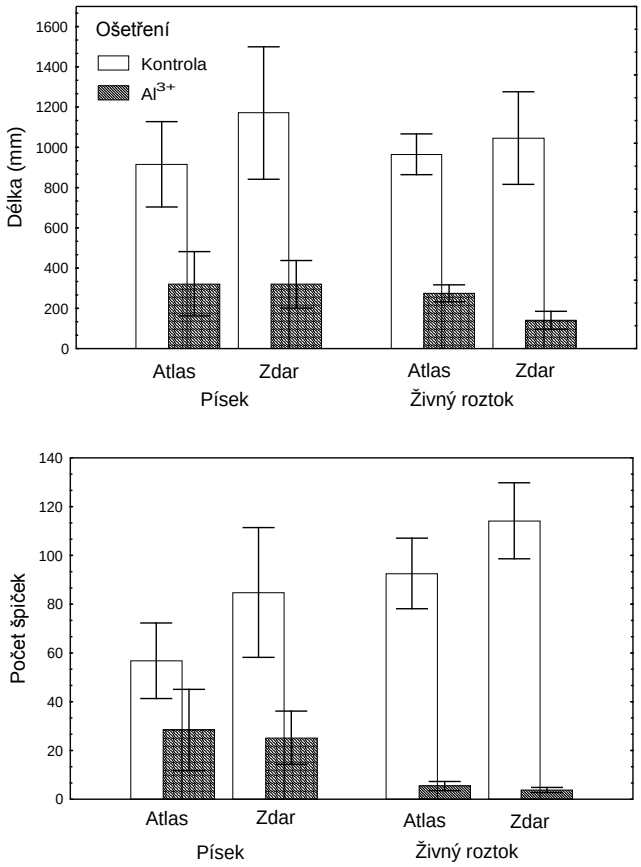
c

d

Obrázek 7.2.2.A: Postupně jsou uvedeny sejmutý obraz kořene (a), binární obraz se zvýrazněnými tenkými kořínky (b), skeletonizovaný binární obraz (c) a automaticky detekované špičky s původním obrazem (d).

Protože má televizní kamera pro naše účely poměrně malé rozlišení (752 x 524 bodů), bylo výhodné zvýraznit tenké kořínky. Binární obraz byl tedy získán logickým součtem (OR) binárního obrazu získaného přímo prahováním sejmutého obrazu a binárního obrazu získaného prahováním sejmutého obrazu zvýrazněného transformací „top hat“, zvýrazňující drobné nebo vláknité struktury. Transformace obrazu „top hat“ je rozdíl hodnoty maxima na okolí pixelu a hodnoty pixelu. Výsledný binární obraz byl skeletonizován, tedy převeden do obrazu sestávajícího z čar jednotkové délky (obrázek 7.2.2.a).
Délka kořene byla stanovena jako polovina délky obvodu kostry. Špičky byly stanoveny z rozdílu obrazu kostry před a po operaci „pruning“, odstraňující extremální body objektů.

7.3 Výsledky



Obrázek 7.2.2.B: Účinek nízkého pH a aluminiové toxicity na celkovou délku a větvení kořenového systému dvou kultivarů pšenice. K měření byla použita počítačová analýza obrazu. Bylo proměřeno 5 rostlin na variantu. Znázorněny jsou průměry s konfidenčními intervaly na hladině 95%.

K měření byly použity kořeny dvou odrůd pšenice, Atlas a Zdar, ovlivněné nízkým pH a aluminiovými ionty, poskytnuté ing. Bláhou z VÚRV Praha. Odrůda Atlas je používána jako mezinárodní standard odolnosti k hlinitým iontům. Kultivace probíhala v živném roztoku nebo v pískové kultuře.
Vliv nízkého pH a aluminiové toxicity na celkovou délku kořenů pšenice a jejich větvení, charakterizované počtem kořenových špiček, je uveden na.obrázku (obrázek 7.2.2.b).
Rozdíly mezi odrůdami se projevily při kultivaci v živném roztoku. Zatímco celková délka kořene vyšla v kontrole stejná a ve stresované variantě větší u odrůdy Atlas, počet kořenových špiček byl větší u odrůdy Zdar v kontrole a stejný u obou odrůd ve stresované variantě.

7.4 Diskuse

Metoda je výhodná při měření dostatečně velkého počtu vzorků, aby se vyplatil čas vynaložený na přípravu zařízení. Pro menší serie vzorků by byla lepší klasická průsečíková metoda pro měření celkové délky a přímé počítání špiček.
Popsaná měření kořene je vhodné doplnit manuálním měřením délky hlavní osy, buď na obrazovce analyzátoru nebo pravítkem na kořeni. Z celkové délky kořenů, počtu postraních kořenů a délky hlavní osy pak lze vypočítat další zajímavé charakteristiky, například průměrnou délku postranních kořenů.

Závěr

Změny fotosyntetického aparátu rostlin pšenice během otužování k mrazu sledované pomocí měření výměny plynů v nízké teplotě, popsané ve druhé kapitole, svědčí o ztrátě limitace fotosyntézy sinkem. Ke sledování výrazných změn lze použít i materiál po jednom týdnu otužování. Mezi různými genotypy ozimé pšenice nejsou příliš výrazné rozdíly ve sledovaných charakteristikách.
Účinky stresu nedostatkem vody vyvolaného roztoky PEG 8000 na fotosyntetickou asimilaci CO_2 u rostlin pšenice, popsané ve třetí kapitole, ukazují, že krátkodobé působení roztoku s vodním potenciálem do -1MPa působí hlavně zavírání stomat a nikoli změny v metabolických procesech fotosyntézy. Genotypové rozdíly mezi kultivary ozimé pšenice, projevující se v koeficientu stomatální limitace nebyly nalezeny.
Po odstranění rušivého vlivu proměnlivých vnějších podmínek na hodnoty rychlosti čisté fotosyntézy rostlin pšenice naměřené ve skleníku se projevily rozdíly mezi rannými a pozdními genotypy. Hodnoty koeficientu stomatální limitace se lišily více mezi variantami, než mezi genotypy. Ze srovnání výsledků z této a předchozí kapitoly provedeného v závěru kapitoly vyplývá, jak je při porovnávání rostlin pomocí koeficientu stomatální limitace důležité brát v úvahu vzdušnou vlhkost.
Metoda na hodnocení mrazuvzdornosti rostlin z výsledků experimentů s řízeným mražením v laboratorních podmínkách z páté kapitoly a metoda třídění odrůd podle zimovzdornosti na základě vyzimování ze šesté kapitoly jsou implementovány v programech pro osobní počítač, uvedených se vzorovými příklady na přiložené disketě, jejíž popis je v příloze.
V sedmé kapitole je demonstrováno úspěšné použití metody pro stanovení délky kořenů pomocí počítačové analýzy obrazu na porovnání odolnosti dvou kultivarů ozimé pšenice k účinkům nízkého pH a aluminiové toxicity.

8 Přílohy

8.1 Příloha A - zdrojová a příjmová funkce

V situaci, kdy je nějaká entita měřitelná extenzivní veličinou (jako energií, látkovým množstvím nebo valutou) produkována a spotřebovávána rychlostí závislou pouze na některé intenzivní veličině c (na potenciálu, koncentraci) a nedochází k jejímu hromadění, lze pro popis rovnováhy příjmu a výdeje použít formalismu zdrojové a příjmové funkce.
Zdrojová funkce S(c) je definována jako rychlost procesu dodávajícího nějakou entitu měřitelnou extenzivní veličinou v závislosti na intenzivní veličině c. Příjmová funkce D(c) je definována jako rychlost procesu spotřebovávajícího nějakou entitu měřitelnou extenzivní veličinou v závislosti na intenzivní veličině c.
Rovnováha nastává při rovnosti rychlosti příjmu a výdeje. Rovnováha je stabilní pokud je směrnice příjmové funkce větší než směrnice zdrojové funkce.

8.2 Příloha B - zpracování údajů z uzavřeného systému LICOR 6000 na PC

8.2.1 vstupní data - příklad

```
PAGE= 82
OBS=  10
 25 MAY 13:35:35
REM1:57 KOJE SU
PRESSURE =         990 mb
CHAMBER VOLUME =    320.0 cm3
LEAF AREA =         12.95 cm2
BLR =                .2500 s/cm
STM RAT =          2
INIT TRAN =          .4074 MMOLES H2O/m2/s
INIT INT CO2 =      47.40 ppm
```

OB	TIME	QU	RH	LT	CT	C2	FL	CM	PM
1	0	377.5	33.97	32.55	32.18	384.0	24.77	.0000	.0000
2	10	379.2	34.90	32.49	32.17	381.7	24.61	.0130	2.162
3	20	377.5	35.75	32.53	32.16	379.5	24.64	.0121	2.159
4	30	376.6	36.63	32.50	32.14	375.8	24.61	.0123	3.601
5	40	375.8	37.44	32.46	32.14	374.8	24.71	.0120	.9606
6	50	377.5	38.24	32.42	32.12	369.5	24.92	.0116	5.041
7	60	381.7	39.07	32.49	32.12	368.3	24.88	.0127	1.198
8	70	381.7	39.86	32.54	32.13	365.5	24.93	.0124	2.641
9	80	381.7	40.59	32.45	32.14	361.0	25.05	.0118	4.321
10	90	376.6	41.34	32.48	32.16	359.8	25.12	.0127	1.200
M	10	378.7	37.79	32.49	32.14	372.0	24.79	.0123	2.587
R	90	5.929	7.371	0.13	0.06	24.18	.4414	.0014	4.080
IV	0	377.2	34.10	32.52	32.16	384.5	24.58	.0124	2.515
IE	0	1.348	.0486	0.02	0.01	.5017	.0604	.0008	1.041

```
PAGE= 83
...
```

8.2.2 jednotka pro práci s textovými řetězci

```
unit strgs;

interface
```

```
function trim(s:string):string;
{orizne mezery z okraju}
function first(s:string):string;
{prvni podretezec odd. mezerou}
function butfirst(s:string):string;
{bez prvniho podd. odd. mez.}
function xchg(s1,s2,s3:string):string;
{v s3 nahradi vyskyty s1 retezcem s2}
function upca(s:string):string;

implementation

function trim(s:string):string;
var
  i:word;
begin
  i:=1;
  while (i<length(s))and(s[i]=' ') do inc(i);
  s:=copy(s,i,length(s)-i+1);
  i:=length(s);
  while (i>0)and(s[i]=' ')do dec(i);
  trim:=copy(s,1,i);
end;

function first(s:string):string;
var
  i:word;
begin
  s:=trim(s);
  i:=pos(' ',s);
  if i=0 then first:=s else first:=copy(s,1,i-1);
end;

function butfirst(s:string):string;
var
  i:word;
begin
  s:=trim(s);
  i:=pos(' ',s);
  if i=0 then butfirst:='' else butfirst:=trim(copy(s,i,length(s)-i+1));
end;

function xchg(s1,s2,s3:string):string;
begin

  while pos(s1,s3)<>0 do
  begin
    s3:=copy(s3,1,pos(s1,s3)-1)+s2
    +copy(s3,pos(s1,s3)+length(s1),length(s3)-pos(s1,s3)-length(s1)+1);
  end;
  xchg:=s3;
end;

function upca(s:string):string;
var
  i:integer;
begin
  for i:=1 to length(s) do s[i]:=upcase(s[i]);
  upca:=s;
end;

end.
```

8.2.3 program KONVERT

```
{výstup z LICORa 6000}

uses strgs;
```

```
const
  cvw=0.00065;
  cvc=0.000385;

var
  vst,vys:text;

var
  s,t,u:string;
  i,j,k,obs:integer;
  qs,q2,ls,l2,cs,c2,fs,f2,ts,t2,pi,ps,p2,pt,as,a2,at,
  tcmea,tlmea,a0,ai,mea,std,p,q,r,r1,la,chv,patm,gs,pn:real;

procedure avg(s,s2:real;obs:word;var mean,std:real);
var
  p:real;
begin
  mean:=s/obs;
  p:=s2-obs*sqr(mean);
  if p<0.0 then p:=0.0;
  std:=sqrt(p/(obs-1));
end;

procedure linreg(sx,s2x,sxy,sy,s2y:real;obs:word;var a,b,stda:real);
{y=ax+b}
var
  d,s2:real;
begin
  d:=1.0/(obs*s2x-sqr(sx));
  a:=(obs*sxy-sx*sy)*d;
  b:=(sy-a*sx)/obs;
  s2:=(s2y-b*sy-a*sxy)/(obs-2);
  stda:=obs*sqrt(s2)*d;
end;

begin
  assign(vst,paramstr(1));
  reset(vst);
  assign(vys,paramstr(2));
  rewrite(vys);
  repeat
    readln(vst,s);
    if trim(s)<>'' then
    begin
      qs:=0.0;q2:=0.0;ls:=0.0;l2:=0.0;cs:=0.0;c2:=0.0;fs:=0.0;f2:=0.0;
      ts:=0.0;t2:=0.0;ps:=0.0;p2:=0.0;as:=0.0;a2:=0.0;pt:=0.0;at:=0.0;
      u:=trim(copy(s,6,3))+',';
      readln(vst,s);
      t:=butfirst(s);
      val(t,obs,i);                              {number of observations}
      if i<>0 then
      begin
        halt
      end;
      u:=u+t+',';
      readln(vst,s);
      u:=u+'"'+trim(s)+'",';                                {time stamp}
      readln(vst,s);
      t:='';
      while pos('REM',s)>0 do
      begin
        t:=t+copy(s,6,length(s)-5)+' ';
        readln(vst,s);
      end;
      u:=u+'"'+t+'",';                                         {remarks}
      while pos('PRESSURE =',s)=0 do readln(vst,s);
      t:=first(copy(s,11,length(s)-10));
      val(t,patm,j);patm:=patm*98.7;
      u:=u+t+',';                                           {pressure Pa}
```

```
repeat
  readln(vst,s);
until pos('CHAMBER VOLUME =',s)>0;
t:=first(copy(s,17,length(s)-16));
val(t,chv,j);chv:=chv/1000000.0;
u:=u+t+',';                                        {chamber volume m3}
repeat
  readln(vst,s);
until pos('LEAF AREA =',s)>0;
t:=first(copy(s,12,length(s)-11));
val(t,la,j);la:=la/10000.0;
u:=u+t+',';                                            {leaf area m2}
repeat
  readln(vst,s);
until trim(s)='';
readln(vst,s);
                                                       {observations}
for i:=1 to obs do
begin
  readln(vst,s);
  s:=butfirst(s);
  t:=first(s);                                                 {time}
  val(t,r1,j);ts:=ts+r1;t2:=t2+sqr(r1);
  s:=butfirst(s);
  t:=first(s);
  val(t,p,j);qs:=qs+p;q2:=q2+sqr(p);                  {irradiance}
  s:=butfirst(s);
  t:=first(s);
  val(t,p,j);                                    {relative humidity 1}
  s:=butfirst(s);
  t:=first(s);
  val(t,q,j);ls:=ls+q;l2:=l2+sqr(q);              {leaf temperature}
  pi:=610.78*exp(17.269*q/(237.3+q));
  s:=butfirst(s);
  t:=first(s);
  val(t,q,j);cs:=cs+q;c2:=c2+sqr(q);          {chamber temperature}
  r:=610.78*exp(17.269*q/(237.3+q));
  r:=r*p/100;                                {partial pressure of H2O}
  r:=ln(pi-r);
  ps:=ps+r;p2:=p2+sqr(r);pt:=pt+r*r1;
  s:=butfirst(s);
  t:=first(s);                                       {CO2 concentration}
  val(t,q,j);as:=as+q;a2:=a2+sqr(q);at:=at+q*r1;
  s:=butfirst(s);
  t:=first(s);
  val(t,p,j);fs:=fs+p;f2:=f2+sqr(p);                {gas flow rate}
end;
avg(qs,q2,obs,mea,std);                             {irradiance +/-}
str(mea:0:0,s);str(std:0:1,t);
u:=u+s+','+t+',';
avg(ls,l2,obs,mea,std);tlmea:=mea;           {leaf temperature +/-}
str(mea:0:1,s);str(std:0:2,t);
u:=u+s+','+t+',';
avg(cs,c2,obs,mea,std);tcmea:=mea;        {chamber temperature +/-}
str(mea:0:1,s);str(std:0:2,t);
u:=u+s+','+t+',';
avg(fs,f2,obs,mea,std);                           {gas flow rate +/-}
str(mea:0:1,s);str(std:0:2,t);
u:=u+s+','+t+',';
linreg(ts,t2,at,as,a2,obs,p,a0,std);            {photosynthesis +/-}
q:=patm*cvc/(8.314*(tcmea+273.15)*la);
pn:=-p*q;std:=std*q;
str(pn:0:1,s);str(std:0:2,t);
u:=u+s+','+t+',';
linreg(ts,t2,pt,ps,p2,obs,p,r,std);                {log pi-po Pa}
pi:=610.78*exp(17.269*tlmea/(237.3+tlmea));
q:=q*cvw/cvc;
gs:=-p*q;
std:=std*q;
```

```
      str(gs:0:3,s);str(std:0:5,t);           {stomatal conductivity +/-}
      u:=u+s+','+t+',';
      str(a0:0:1,s);
      ai:=a0-pn*1.6/gs;
      str(ai:0:1,t);
      u:=u+s+','+t;
      writeln(vys,u);
      repeat
        readln(vst,s);
      until trim(s)='';
    end;
  until eof(vst);
  close(vys);
end
```

8.2.4 výstupní data - formát

číslo stránky, počet pozorování, čas, poznámky, atmosférický tlak, objem systému, listová plocha, ozářenost, standardní chyba, teplota listu, st.ch., teplota komory, st.ch., průtok, st.ch., rychlost fotosyntézy, st.ch., stomatální vodivost, st.ch., počáteční koncentrace CO_2 v okolí listu, počáteční intercelulární koncentrace CO_2

8.2.5 výstupní data - příklad

```
82,10,"25 MAY 13:35:35","57 KOJE SU",
      990,320.0,12.95,379,2.3,32.5,0.04,32.1,0.02,24.8,0.18,3.2,0.00,0.025,
      0.00001,384.5,182.8
83,10,"25 MAY 13:46:17","57 KOJE VLH ",
      990,320.0,11.55,371,1.7,31.9,0.08,32.4,0.05,24.8,0.08,6.3,0.00,0.069,
      0.00001,388.3,243.6
84,....
```

8.3 Příloha C - popis přiložené diskety

Disketa je zkontrolována antivirovým programem SCAN 2.2.12 dne 1.10.1996 a zajištěna proti zápisu, což ale znemožňuje například ukládání výsledků z programu LT50.
Program provýpočet kritické teploty se spouští ze souboru LT50.EXE. Je řízen pomocí srozumitelného systému menu. Po otevření vzoroveho souboru dat JIRI-JA.DTT se spusti editor dat, ten se opouští pomoci klávesy ESC. Uložené výsledky regrese v souboru JIRI-JA.VYS lze vzajemne srovnavat programem LV50.EXE. Jeho ovladani je opět zřejmé, lze libovolně vybírat skupiny měření, výběr sad výsledků se provádí mezerníkem.
Program pro třídění se spouští ze souboru TRID.EXE. Prvni obrazovka slouží k výběru adresaře, zmačkne se ENTER. Na druhé obrazovce vybereme vzorový soubor dat publikovaných v práci Prášil a kol., 1989, POKUS001.DBF. V dalsi obrazovce vybereme data pro vypocet, pohybujeme se pomocí vodorovných a svislých šipek, vybíráme pomocí ENTER nebo hromadně sekvencí (END, „šipka nahoru“,) „tečka“, END, „šipka dolů“, „plus“. Po výpočtu, který se spouští klávesou CTRL+C, se dostaneme do první obrazovky výsledků, po dalším CTRL+C do druhé obrazovky výsledků, kde se ukáže přesnější odhad standardní chyby výsledků a navíc homogenní skupiny odrůd. Při druhém výpočtu se užívá přesnější metody, která však funguje pouze pro malé soubory dat.
Oba programy jsou volně šířitelné.

9 Citace

Apel, P., Lehmann, C.O.: Variabilität und sortenspezifität der photosyntheserate bei sommergerste. -Photosynthetica 3, 255-262, 1969.

Ball, J.T.: Calculations related to gas exchange. - ve E.Zeiger, G.D.Farquhar and I.R.Cowan (editoři), Stomatal function, Stanford University Press, Stanford, CA, USA, 445-476, 1987

Barlow, E. W. R: Water relations of expanding leaves. -Aust. J. Plant Physiol. 13, 45-58, 1986.

Blum, A.: Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. -Crop. Sci. 29, 230-233, 1989.

Brooks, A., Farquhar, G. D.: Effect of temperature on the CO_2/O_2 specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Estimates from gas exchange measurements on spinach. -Planta 165, 397-406, 1985.

Canny, M. J.: Water pathways in wheat leaves. IV. The interpretation of images of a fluorescent apoplastic tracer. -Aust. J. Plant Physiol. 15, 541-545, 1988.

Corlett, J. E., Jones, H. G., Massacci, A., Masojídek, J.: Water deficit, leaf rolling and susceptibility to photoinhibition in field grown sorghum. -Physiol. Plant. 92, 423-430, 1994.

Čatský, J., Solárová, J., Pospíšilová, J., Tichá, I.: Conductances for carbon dioxide transfer in the leaf. - ve Zdeněk Šesták (editor) Photosynthesis during leaf development, Academia, Praha, 217-249, 1985.

Dietz, K. J., Schreiber, U., Heber, U.: The relationship between the redox state of Q_A and photosynthesis in leaves at various carbon-dioxide, oxygen and light regimes. -Planta 166, 219-226, 1985.

Edwards, G., Walker, D.: C_3, C_4: mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. -Blackwell scientific publications, Oxford, 1983.

Fahn, A.: Plant anatomy, 4^{th} ed. -Pergamon Press, Oxford, 1990.

Farrell, R. E., Walley, F. L., Lukey, A. P., Germida, J. J.: Manual and digital line-intercept method of measuring root length: a comparison. -Agronomy Journal. 85, 1233-1237, 1993.

Farquhar, G. D.: Models describing the kinetics of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. -Arch. Biochem. Biophys. 193, 456-468, 1979.

Farquhar, G. D., Caemerer, S. von, Berry, J. A.: A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. - Planta 149, 78-90, 1980.

Farquhar, G. D., Sharkey, T. D.: Stomatal conductance and photosynthesis. -Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 317-345, 1982.

Flugge, U.I.: Physiological function and physical characteristics of the chloroplast phosphate translocator. -Progress in Photosynthesis Research, Proc. of VIIth Int. Congress on Photosynthesis, Providence, RI, USA, August 10-15,1986, 1986.

Foy, C.D.: The physiology of plant adaptation to mineral stress. -Iowa State Journal of Research. 57, 1007-1017, 1983.

Furbank, R. T, Taylor, W. C.: Regulation of photosynthesis in C_3 and C_4 plants: a molecular approach. -The Plant Cell 7, 797-807, 1995.

Gaastra, P.: Photosynthesis of crop plants as influenced bz light, carbon dioxide, temperature and stomatal diffusion resistance. -Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen 59, 1-68, 1959.

Geacintov, N. E., Breton, J.: Energy transfer and fluorescence mechanisms in photosynthetic membranes. -CRC Critical Reviews in Plant Sci. 5, 1-44, 1987.

Geiger, D. R., Servaites, J. C.: Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C_3 plants. -Annu. Rev. Plant Physiol. 45, 235-256, 1994.
Ghasghaie, J., Cornic, G.: Effect of temperature on partitioning of photosynthetic electron flow between CO_2 assimilation and O_2 reduction and on the CO_2/O_2 specificity of rubisco. -J. Plant Physiol. 143, 643-650, 1994.
Gunasekera, D., Berkowitz, G. A.: Heterogenous stomatal closure in response to leaf water deficits ls not a universal phenomenon. -Plant Physiol. 98, 660-665, 1992.
Gunasekera, D., Berkowitz, G. A.: Use of transgenic plants with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. -Physiol. Plant. 103, 629-635, 1993.
Hábr, E.: Úvod do chemické termodynamiky. -Academia, Praha, 1975.
Harley, P. C., Sharkey, T. D.: An improved model of C_3 photosynthesis at high CO_2 : Reversed O_2 sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. -Photosynth. Res. 27, 169-178, 1991.
Harris, G. A., Campbell, G. S.: Automated quantification of roots using a simple image analyzer. -Agron. J. 81, 935-938, 1989.
Heldt, H. W., Flugge, U.-I., Borchert, S., Bruckner, G., Ohnisi, J.: Phosphate translocators in plastids. -in Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis, I.Zelitch and N.S. Allen eds., Wiley-Liss, 39-54, 1990.
Heldt, H. W., Werdan, K., Milovancev, M., Geller, G.: Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. -Biochim. Biophys. Acta 314, 224-241, 1973.
Hsiao, T. C.: Plant responses to water stress. -Annu. Rev. Plant Physiol. 24, 519-570, 1973.
Huner, N.P.A., Migus, W., Tollenaar, M.: Leaf CO_2 exchange rates in winter rye grown at cold-hardening and nonhardening temperatures. -Can.J.Plant Sci. 66, 443-452, 1986.
Huner, N.P.A., Öquist, G, Hurry, V.M., Krol, M., Falk, S., Griffith, M.: Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. -Photosynt. res. 37, 19-39, 1993.
Chaves, M. M.: Effects of water deficits on carbon assimilation. -J. exp. Bot. 42, 1-16, 1991.
Janáček, J., Prášil, I.: Quantification of Plant frost injury by nonlinear fitting of an S-Shaped function. -Cryo-letters 12, 47-52, 1991.
Janáček, J., Prášil, I: Stimulation of net photosynthetic rate of two wheat cultivars by 1kPa O_2 during the low temperature acclimation. -Photosynthetica 26, 341-346, 1992.
Johnson, R. C., Mornhinweg, D. W., Ferris, D. M., Heitholt, J. J.: Leaf photosynthesis and conductance of selected Triticum species at different water potentials. -Plant Physiol. 83, 1014-1017, 1987.
Joliffe, P.A., Tregunna, E.B.: Effect of temperature, CO_2 concentration and light intensity on oxygen inhibition of photosynthesis in wheat leaves. -Plant Physiol. 43, 902-906, 1968.
Jones, H. G., Massacci, A., Corlett, J., Masojidek, J., Hall, D.: Use of combined fluorescence and gas-exchange measurements to assess processes limiting photosynthesis under stress. -Bull. Soc. Bot. 137, 67-72, 1990.
Kaiser, W. M.: Effects of water deficit on photosynthetic capacity. -Physiol. Plant. 71, 142-149, 1987.
Kearns, E. V., Assmann, S. M.: The guard cell-environment connection. -Physiol. Plant. 102, 711-715, 1993.
Kikuta, S. B., Richter, H.: Leaf discs or press saps? A comparison of techniques for the determination of osmotic potentials in freeze-thawed leaf material. -J. exp. Bot. 43, 1039-1044, 1992.

Kobza, J., Seemann, J. R.: Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to diurnal changes in irradiance. -Plant Physiol. 89, 918-924, 1989.
van Kraalingen, D. W. G.: Implications of non-uniform stomatal closure on gas exchange calculations. -Plant Cell Env. 13, 1001-1004, 1990.
Kubínová, L.: Recent stereological methods for the measurement of leaf anatomical characteristics: estimation of volume density, volume and surface area. -J. exp. Bot. 44, 165-173, 1993.
Labate, C.A., Adcock, M.D., Leegood, R.C.: Effects of temperature on the regulation of photosynthetic carbon assimilation in leaves of maize and barley. -Planta 181, 547-554, 1990.
Laisk, A.: Кинетика фотосинтеза и фотодыхания C_3 растений. Nauka, Moskva, 1977.
Laisk, A., Sumberg, A.: Partitioning of the leaf CO_2 exchange into components using CO_2 exchange and fluorescence measurements. - Plant Physiol. 106, 689-695, 1994.
Laisk, A.: Calculation of leaf photosynthetic parameters considering the statistical distribution of stomatal apertures. -J. exp. Bot. 34, 1627-1635, 1983.
Lauer, M. J., Boyer, J. S.: Internal CO_2 measured directly in leaves, abscisic acid and low water potential cause opposing effects. -Plant Physiol. 98, 1310-1316, 1992.
Lehnherr, B., Machler, F., Nosberger, J.: Influence of temperature on the ratio of ribulose bisphosphate carboxylase to oxygenase activities and on the ratio of photosynthesis to photorespiration of leaves. -J. exp. Bot. 36, 1117-1125, 1985.
Lewitt, J.: Responses of plants to environmental stresses. -2nd ed., Academic Press, London,, 1980.
Lockhart, J. A.: An analysis of irreversible plant cell elongation. -J. Theor. Biol. 8, 264-275, 1965.
Loreto, F., Harley, P. C., Di Marco, G., Sharkey, T. D.: Estimation of mesophyll conductance to CO_2 flux by three different methods. -Plant Physiol. 98, 1437-1443, 1992.
Magnuson, C. E., Goeschl, J. D., Fares, Y.: Experimental tests of the Munch-Horwitz theory of phloem transport: effects of loading rates. -Plant Cell Env. 9, 103-109, 1986.
McCledon, J. H.: The osmotic pressure of concentrated solutions of polyethylene glycol 6000, and its variation with temperature. - J. exp. Bot. 32, 861-866, 1981.
McCree, K. J.: Whole-plant carbon balance during osmotic adjustment to drought and salinity stress. -Aust. J. Plant. Physiol. 13, 33-43, 1986.
McDermitt, D. K.: Sources of error in the estimation of stomatal conductance and transpiration from porometer data. -Hort Science 25, 1538-1548, 1990.
McNaughton, K.G., Jarvis, P.G.: Effects of spatial scale on stomatal control of transpiration-Agric. Forest Meteo. 54, 279-301, 1991.
Minchin, P. E. H., Thorpe, M. R.: Is phloem transport due to a hydrostatic pressure gradient? Supporting evidence from pressure chamber experiments. -Aust. J. Plant Physiol. 14, 397-402, 1987.
Morgan, J. M.: Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat-Aust. J. Agric. Res. 34, 607-614, 1984.
Mott, K. A., Parkhurst, D. F.: Stomatal responses to humidity in air and helox. -Plant Cell Env. 14, 509-515, 1991.
Mott, K. A.: Do stomata respond to CO_2 concentration other than intercellular? -Plant Physiol. 86, 200-203, 1988.
Nátr, L., Pazourek, J.: Genotypic differences and heterogeneity in the stomatal frequency of barley leaves. -Photosynthetica 20, 363-370, 1986.
Nátrová, Z.: Stupnice pro hodnocení vývoje rostlin obilnin. -Úroda 11, 488-491, 1992.
Newman, E.I.: A method of estimating the total length of root in a sample. -J.Appl.Ecol. 3: 139-145, 1966.

Nonami, H., Boyer, J. S.: Turgor and growth at low water potentials. -Plant Physiol. 89, 798-804, 1989.
Novák, F.A.: Vyšší rostliny. -Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1961.
Osmond, C. B., Chow, W. S.: Ecology of photosynthesis in the sun and shade: summary and prognostications. -Aust. J. Plant Physiol. 15, 1-9, 1988.
Öquist, G., Huner, N.P.A.: Cold-hardening-induced resistance to photoinhibition of photosynthesis in winter rye is dependent upon an increased capacity for photosynthesis. -Planta 189, 150-156, 1993.
Öquist, G., Hurry, V.M., Huner, N.P.A.: Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. -Plant Physiol. 101, 245-250, 1993.
Palovský, R., Hák, R.: A model of light-dark transition of CO_2 exchange in the leaf (post-illumination burst of CO_2). Theoretical approach. -Photosynthetica 22, 423-430, 1988.
Palovský, R., Hák, R.: How to calculate the non-steady state photosynthetic rate measured in open flow system. -Photosynthetica 23, 691-694, 1989.
Parkhurst, D. F., Mott, K. A.: Intercellular diffusion limits to CO_2 uptake in leaves, studies in air and helox. -Plant Physiol. 94, 1024-1032, 1990.
Parkhurst, D. F.: Stereological methods for measuring internal leaf structure variables. -Amer. J. Bot. 69, 31-39, 1982.
Peterson, R. B.: Quantitation of the O_2-dependent, CO_2-reversible component of the postillumunation CO_2 exchange transient in tobacco and maize leaf. -Plant Physiol. 84, 862-867, 1987.
Prášil, I., Palovský, R., Rogalewicz, V., Zámečník, J.: Classification of wheat cultivars for winterhardiness from multi-year trials. - Scientia Agric. Bohemoslov., 21, 85-90, 1989
Prášil, I, Papazisis, Janáček, J., Prášilová, P.: Zimovzdornost a stupně odolnosti českých a slovenských odrůd ozimé pšenice. -Rostlinná výroba 40, 803-816, 1994.
Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., Holaday, A. S.: Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. -Crop Sci. 30, 105-111, 1990.
Saeki, T: Interrelationships between leaf amount, light distribution and total photosynthesis in a plant community. -Bot. Mag. (Tokyo) 73, 55, 1960.
Sage, R.F., Sharkey, T.D.: The effect of temperature on the occurrence of O_2 and CO_2 insensitive photosynthesis in field grown plants. -Plant Physiol. 84, 658-664, 1987.
Sage, R. F.: A model describing the regulation of ribulose -1,5-bisphosphate carboxylase, electron transport, and triose phosphate use in response to light intensity and CO_2 in C_3 plants. -Plant Physiol. 94, 1728-1734, 1990.
Selye, H.: A syndrome produced by various noxious agents. -Nature 138, 32-34, 1936.
Sharkey, T. D.: Estimating the rate of photorespiration in leaves. -Physiol. Plant. 73, 147-152, 1988.
Sharkey, T. D.: Photosynthesis in intact leaves of C_3 plants: physics, physiology and rate limitations. -The Botanical Review 51, 53-105, 1985.
Sharkey, T. D., Seemann, J. R.: Mild water stress effects on carbon-reduction-cycle intermediates, ribulose bisphosphate carboxylase activity,and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. -Plant Physiol. 89, 1060-1065, 1989.
Schnyder, H., Machler, F., Nosberger, J.: Regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase activity associated with lack of oxygen inhibition of photosynthesis at low temperature. -J. exp. Bot. 37, 1170-1179, 1986.
Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C.: Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. -in Ecological studies 100,

Ecophysiology of photosynthesis, E-D Shulze a M.M. Caldwell, Springer, 49-70, 1994.
Schuepp, P. H.: Leaf boundary layers. -New Phytol. 125, 477-507, 1993.
Viil, J., Laisk, A., Oja, V., Parnik, T.: Enhancement of photosynthesis caused by oxygen under saturating irradiance and high CO_2 concentration. -Photosynthetica 11, 251-259, 1977.
Vogelmann, T. C., Martin, G.: The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. - Plant Cell Env. 16, 65-72, 1993.
Wiebe, H. H., Campbell, G. S., Gardner, W. H., Rawlins, S. L., Cary, J. W., Brown, R. W.: Measurements of plant and soil water status. -Bulletin of Utah Agricultural Experiment Station 484, 1-71, 1971.
Williams, J. H. H., Farrar, J. F.: Endogenous control of photosynthesis in leaf blades of barley. -Plant Physiol. Biochem. 26, 503-509, 1988.
Wolswinkel, P.: Phloem unloading and turgor-sensitive transport: Factors involved in sink control of assimilate partitioning. - Physiol. Plant. 65, 331-339, 1985.
Woodrow, I.E., Ball, J.T., Berry, J.A.: Control of photosynthetic carbon dioxide fixation by the boundary layer,stomata and ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. - Plant Cell Env. 13, 339-347, 1990.
Zhu, G.H., Liu, Z.Q.: Determination of median lethal temperature using logistic function. - in „Plant cold hardiness:, P.H.Li, ed. Alan R. Liss, New York, 291-298, 1987.
Zoon, F.C., van Tienderen, P.H., 1990: A rapid quantitative measurement of root length and root branching by microcomputer image analysis. -Plant and Soil 126, 301-308, 1990.