

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

2118806

**EKOFYZIOLOGICKÁ CHARAKTERIZÁCIA TISU
OBYČAJNÉHO (*Taxus bacata* L.)**

2010

Bc. Peter Petruška

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

**EKOFYZIOLOGICKÁ CHARAKTERIZÁCIA TISU
OBYČAJNÉHO (*Taxus bacata* L.)**

Diplomová práca

Študijný program:	Výživa ľudí
Študijný odbor:	6.1.12 Výživa
Školiace pracovisko:	Katedra fyziológie rastlín
Školiteľ:	Ing. Marek Kovár PhD.

Nitra, 2010

Bc. Peter Petruška

Čestné vyhlásenie

Podpísaný Peter Petruška vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Ekofyziologická charakterizácia tisu obyčajného (*Taxus bacata* L.)“ vypracoval samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomý zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 15. apríla 2010

Peter Petruška

Pod'akovanie

Touto cestou si dovoľujem poďakovať svojmu školiteľovi Ing. Marekovi Kovárovi, PhD. za jeho odborné vedenie, cenné rady a pomoc pri vypracovaní mojej diplomovej práce keďže bez neho by táto práca „neuzrela“ svetlo sveta.

Taktiež by som sa chcel touto cestou poďakovať svojej priateľke za psychickú a morálnu podporu, ktorú mi poskytovala počas môjho celého štúdia. Norika si mojou jasnou hviezdou, ktorá mi ukazuje správnu cestu k cieľu.

Obom vám chcem vyjadriť svoje veľké **ĎAKUJEM**.

Abstrakt

Úspech anti-rakovinovej látky zvanej Taxol, získanej z kôry rastlín tisú západoamerický (*Taxus brevifolia*) zvýšil záujem o pestovanie a regeneráciu tohto málo známeho druhu rastliny. Účinná látka bola objavená v roku 1960. Rozšírenie medicínskeho používania účinnej látky podnietilo výskum hľadania optimalizačných technológií kultivácie rastlín. Základom takejto optimalizácie je poznanie aktivity fyziologických procesov, najmä fotosyntézy. Cieľom našej práce bolo kvantifikovať základné fyziologické procesy rastlín tisú obyčajného (*Taxus baccata* L.) rastúceho v prirodzených podmienkach prostredia Botanickej záhrady SPU v Nitre. Náhodným výberom sme odobrali jednorôčné výhony zo slnnej a tiennej strany koruny. Merali sme charakteristiky ako: relatívny obsah vody a pomer obsahu voľnej k obsahu viazanej vody (obe gravimetricky), koncentráciu asimilačných pigmentov (spektrofotometricky), využitie energie pre fotochemické a nefotochemické procesy fotosyntézy (fluorescencia chlorofylu *a*). Z našich výsledkov je zrejmé, že v zimnom období rastlina tisú optimalizuje vodný režim pre udržanie vody v kvapalnom stave prostredníctvom zvýšenia obsahu vody viazanej. V zime je svetelná energia disipovaná nefotochemickým procesom. V jarnom období nastáva aktivácia fyziologických procesov, doprevádzaná zmenou v distribúcii svetelnej energie do fotochemických mechanizmov. Tento výsledok je potvrdený aj zmenou kompozície asimilačných pigmentov. Potvrdili sme všeobecne prijímané závery o činnosti primárnych fotochemických procesov v slnných a tienných ihliciach.

Kľúčové slová: *Taxus baccata*, fotosyntéza, vodný režim, OJIP.

Abstract

The success of anti-cancer substance called Taxol, acquired from the bark of yew plants (*Taxus brevifolia*) has increased interest in the cultivation and recovery of this little-known plant species. The active substance was discovered in 1960. Extension of the medical use of active substances stimulate research into optimization of technology of cultivation of plants. The optimization of such activities is the knowledge of physiological processes, especially photosynthesis. The aim of our study was to quantify basic physiological processes of plants yew (*Taxus baccata* L.) growing under natural environmental conditions Botanic Gardens SPU Nitra. Random one-year shoots were taken from sun and shade side the crown. We measured characteristics such as: relative water content, the ratio of free to bound water content (both gravimetrically), the concentration of assimilation pigments (spectrophotometrically), use of energy for photochemical and non-photochemical processes of photosynthesis (chlorophyll *a* fluorescence). From our results it is clear that in the winter plant yew optimize water resources to sustain water in liquid state by increasing the water content coupled. In winter light energy disipated non-photochemical process. In the spring occurs activation of physiological processes, accompanied by a change in the distribution of light energy into photochemical mechanisms. This result is confirmed by the changing composition of assimilatory pigments. We have confirmed the general conclusions about the actions taken by the primary photochemical processes in sun and shade needles.

Keywords: *Taxus baccata*, photosynthesis, water regime, OJIP.

Obsah

Obsah	6
Zoznam skratiek a značiek.....	8
Úvod	10
1 Súčasný stav riešenej problematiky	11
1.1 Charakteristika tisú.....	11
1.2 Klasifikácia tisú.....	12
1.3 Výskyt tisú.....	13
1.4 Použitie tisú	14
1.5 Sekundárny metabolizmus látok.....	15
1.6 Taxol.....	16
1.7 Historický prehľad využívania taxolu	17
1.8 Mechanizmus účinku taxolu.....	18
1.9 Biotechnológie a produkcia taxolu.....	19
1.9.1 Explantátové techniky.....	20
1.9.2 Bunkové kultúry.....	21
1.10 Získavanie taxolu.....	23
1.10.1 Získavanie taxolu zo stromov	23
1.10.2 Enzymatická semisyntéza	23
1.10.3 Semisyntéza taxolu	24
1.10.4 Produkcia taxolu pomocou húb a mikroorganizmov	25
1.10.5 Produkcia taxolu bunkovými kultúrami.....	26
1.11 Ekofyziologická charakteristika tisú	29
1.11.1 Fotosyntéza	29
1.11.2 Fotosyntetické štruktúry.....	30
1.11.3 Vplyv faktorov prostredia na fotosyntézu.....	35
1.11.4 Dýchanie rastlín	40
1.11.5 Rozdelenie procesov dýchania.....	41
1.11.6 Faktory ovplyvňujúce dýchanie.....	42
1.11.7 Vodný režim rastlín.....	44
1.11.8 Poikolihydrické rastliny	45
1.11.9 Homoiohydrické rastliny	45

1.11.10	Príjem a transport vody rastlinou.....	46
1.11.11	Výdaj vody (transpirácia)	47
1.11.12	Faktory ovplyvňujúce transpiráciu	49
2	Cieľ práce.....	52
3	Metodika práce.....	53
3.1	Charakteristika biologického materiálu.....	53
3.2	Analýza fluorescencie chlorofylu <i>a</i>	53
3.2.1	Rýchla kinetika fluorescencie chlorofylu <i>a</i>	53
3.2.2	Základné pojmy:	54
3.2.3	Parametre JIP testu.....	54
3.3	Kvantitatívne stanovenie asimilačných pigmentov	55
3.4	Stanovenie vody v rastline.....	56
3.4.1	Stanovenie obsahu celkovej vody.....	56
3.4.2	Stanovenie obsahu voľnej vody v pletive refraktometricky	57
3.4.3	Stanovenie obsahu viazanej vody	57
3.4.4	Stanovenie relatívneho obsahu vody RWC	57
3.5	Spracovanie výsledkov	58
4	Výsledky práce a diskusia	59
	Záver	70
	Zoznam použitej literatúry	72

Zoznam skratiek a značiek

ABS – absorpčný tok

ABS/RC – priemerná veľkosť antén, efektívna veľkosť antén aktívneho reakčného centra. Vyjadruje celkový počet fotónov absorbovaných molekulami chlorofylu všetkých reakčných centier.

Area – plocha medzi fluorescenčnou krivkou a hodnotou F_M (veľkosť zásoby akceptorou elektrónového transportu PSII)

ASP - askorbátperoxidáza

ATP – adenzíntrifosfát

DEBAC III – 10-deacetylbaaccatin III

DI – tepelná disipácia – uvoľnenie energie vo forme tepla

dv/dt_0 (M0) – počiatočný sklon fluorescenčnej krivky, ktorá vyjadruje rýchlosť akumulácie uzavretých reakčných centier

ET - elektrónový transport z reakčného centra na primárny akceptor

ET_0/CS_0 – elektrónový transport prepočítaný na excitované cross section, reoxidácia redukovaného Q_A cez elektrónový transport

ET_0/RC - elektrónový transport v aktívnych RC, reoxidácia redukovaného Q_A cez elektrónový transport v aktívnom RC

F – fluorescencia

$F_0 - F_{50\mu s}$, fluorescencia pri $50\mu s$ (počiatočná fluorescencia)

F_0 – výťažok minimálnej fluorescencie

F_0/F_M - bazálny kvantový výťažok nefotochemických

F_1 - fluorescencia v kroku I (30ms)

F_{150} – fluorescencia pri $150\mu s$

F_{300} – fluorescencia pri $300\mu s$

F_J – fluorescencia v kroku K (2ms)

F_M – maximálna fluorescencia

F_M – výťažok maximálnej fluorescencie

F_V – variabilná fluorescencia daná ako rozdiel maximálnej a počiatočnej fluorescencie

F_V – variabilná fluorescencia daná ako rozdiel maximálnej a počiatočnej fluorescencie

F_V/F₀ – maximálny pomer kvantových výťažkov fotochemických procesov a konkurenčných nefotochemických procesov

F_V/F_M – maximálna fotochemická efektívnosť PSII

F_V/F_M – maximálna fotochemická efektívnosť PSII

LAR – pomerná olistenosť

NADP – nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát

OJIP – O – J – I - P fázy rýchlej kinetiky indukovanej fluorescencie

PHI_{D0} – výťažok technickej disipácie

PHI_{E0} – maximálny výťažok elektrónového transportu

PS I – fotosystém I

PS II – fotosystém II

PSI₀ – kapacita transferu excitónu k elektrónovému transportnému reťazcu

Q_A – plastochinón vo väzbovom mieste A

Q_B – plastochinón vo väzbovom mieste B

qN – nefotochemické uhasínanie fluorescencie

qP – fotochemické uhasínanie fluorescencie

RC – plne aktívne reakčné centrá

ROS – (*reactive oxygen species*) voľné kyslíkové radikály

RS – refraktometrická sušina

RWC – relatívny obsah vody

SLA – špecifická listová plocha

S_m – vyjadruje energiu potrebnú na zatvorenie všetkých reakčných centier

T_{imax} – čas potrebný na dosiahnutie maximálnej fluorescencie v ms

TR – transport elektrónov z antén do reakčného centra (trapping flux)

TR₀/CS₀ – prenos excitónu na reakčné centrum prepočítaný na excitované cross section

TR₀/RC – maximálna rýchlosť zachytávania PSII – tok excitónov na reakčné centrá

V_I – relatívna variabilná fluorescencia v čase I

V_J – relatívna variabilná fluorescencia v čase J

Úvod

Prírodné produkty sa oddávna používali ako účinné látky pri liečbe rôznych chorôb a preto aj v dnešnej dobe príroda zostáva hlavným zdrojom liečiv ako sú napríklad protirakovinové látky. Mnohé farmaceuticky významné látky boli izolované práve z rastlín, živočíchov, húb a mikroorganizmov. Napriek tomu, že chemickou cestou je možné syntetizovať mnoho bioaktívnych látok, výskum zameraný na hľadanie nových, účinných zlúčenín sa orientuje stále viac na prírodné zdroje, ako sú rastliny a mikroorganizmy, ktoré sú bohatým zdrojom substancií rôznych chemických štruktúr a biologicky aktívnych látok. Príkladom takýchto biologicky aktívnych látok sú sekundárne metabolity, ktoré sú produkované mikroorganizmami, prípadne vyššími rastlinami. Rastliny produkujú veľké množstvo sekundárnych metabolitov, ktoré sú odpoveďou organizmu voči patogénom, alebo reakciou na abiotický stres.

Keďže potreba objavovať nové účinnejšie liečivá z dôvodu prudkého nárastu civilizačných chorôb, akou je napríklad rakovina, narastá, sme nútení začať objavovať tieto látky a hľadať možnosti ich získavania.

V našej práci v prvej časti predkladáme prehľad o najnovších poznatkoch riešenej problematiky a zameriavame sa na stručnú charakteristiku tisu obyčajného (*Taxus baccata* L.), jeho metabolitov sekundárneho metabolizmu a foriem ich získavania. Ďalej sme sa zamerali na popísanie ekofyziologických charakteristík tisu akými sú fotosyntéza, dýchanie a vodný režim a vplyv vonkajších faktorov na tieto fyziologické faktory, preto že si myslíme, že tieto ekofyziologické faktory sú jedny z najdôležitejších faktorov pre rast rastlín a produkciu biologicky aktívnych látok, ktoré sa dajú využiť v biomedicíne.

1 Súčasný stav riešenej problematiky

1.1 Charakteristika tisú

Tis je nižší strom, ktorý dorastá do výšky 5 – 15 (17,5) m, často ide len o viac kmenný rozložito rozkonárený ker (Paganová, 2001).

Koruna je kužeľovitá až nepravidelná. Konáre sú za mlada v nepravidelných praslenoch, neskôr takmer vodorovne odstavajú. Kôra je červenohnedá až sivohnedá. Kmeň je často pozdĺžne valcovitý s laločnatým priebehom letokruhov. Nápadné sú mnohé adventívne výhonky, ktoré sa tvoria na kmeni už pri najmenšom osvetlení, ale najmä pri jeho poškodení. Má silnú pňovú výmladnosť (Pagan a Randuška, 1987).

Púčiky sú vajcovité, 3 – 4 x 2 mm široké, červenkasto hnedé. Výhonky sú svetlozelené, neskôr svetlo hnedé a potom červenkasto hnedé, lysé. Ihlice sú špirálovito rozmiestnené, veľké 20 – 30 mm x 2 – 2,5 mm, čiarkovité, ploché, končisté, mäkké, na báze náhle zúžené do krátkej stopky, ktorá zbieha po konárik. Na vrchnej strane sú tmavozelené lesklé a na spodnej strane žlté zelené a matné (Vreštiak a Osvald, 1994).

Tis je dvojdomá, výnimočne len jednodomá rastlina. Kvitne v marci až v apríli; samčie šištinky majú 3 mm, sú guľaté, krátkostopkaté a žlté s 8 - 10 tyčinkami. Viditeľné sú už v jeseni v pazuchách ihlíc, husto zoskupené na spodnej strane konárikov. Samičie šištinky sa podobajú štíhlym púčikom, majú jednokoncové priame vajíčko s mykropyllou, ktoré je obalené párnami protistojných šupín (Pagan a Randuška, 1987).

Samčie jedince prvýkrát kvitnú asi v 10. roku života, samičie jedince asi o desať rokov neskôr. Kvitnutie prebieha v marci a apríli. Plodom je miešok, najprv je zelený a koncom leta je krvavo červený o veľkosti 5 – 7 mm, obsahujúci semeno. Miešky môžu byť niekedy svetločervené (*Taxus canadensis*) alebo žlté (niektoré kultivary *Taxus baccata*) (Hieke, 1978).

Semeno je oválne, vajcovité, prihrotené, jemne stlačené s 2 – 4 hranami a tmavohnedým pevným osemením. Je obklopené pohárikovitým rôsolovitým

karmínovočerveným mieškom, ktorý je požívateľný, kým ostatné časti obsahujú jedovatý alkaloid taxín. Semeno dozrieva v auguste až septembri (Paganová, 2001).

Tisy patria medzi najdlhšie žijúce dreviny. Ich cennosť je daná najmä ich znášanlivosťou k hlboko zatieneným stanovištiam, vynikajúcou regeneračnou schopnosťou a odolnosťou k znečistenému prostrediu (Lukáčik a Nič, 1996).

1.2 Klasifikácia tisu

Tisy patria do rovnomennej triedy Tisy – Taxospida a do čeľade Tisovité – Taxaceae. Patrí sem päť rodov a pätnásť druhov. Celkovo existuje asi osem druhov, ktoré si sú veľmi podobné a sú rozšírené na severnej pologuli. Baloglu a Kingston (1999) uvádzajú porovnanie triviálnych a botanických názvov, ktoré je uvedené v tabuľke 1.

Delenie tisu zo sadovníckeho hľadiska podľa habitu (Hieke, 1978):

- „*baccata*“ – nízky stromovitý typ so širokou, trochu nepravidelnou, prevažne vajcovitou až guľovitou korunou. Konáre vystupujú viac-menej vodorovne, alebo mierne šikmo nahor.
- „*pendula*“ – pomerne bujne rastúci stromček s konármi previsnutými pozdĺž kmeňa, vetvičky tiež previsnuté.
- „*gracilis*“ – krovitý typ s riadne vyvinutým vzpriameným vrcholom a ovisnutými vetvičkami.
- „*cupsidata*“ – pomerne riedko stavaný ker s rozložito stúpajúcimi konármi, vzdušný, riedky, pologuľovitý.

Pre plantážnické pestovanie tisov pre zber ihličia a na farmaceutické účely sa ako vhodné javia habituálne formy „*baccata*“, „*overeynderi*“ a „*erecta*“.

V našich podmienkach sa sadovnícky využívajú nasledovné druhy (Hieke, 1978):

- *Taxus baccata* L. – tis obyčajný (červený)
- *Taxus brevifolia* NUTT. – tis západoamerický
- *Taxus canadensis* MARSH. – tis kanadský
- *Taxus celebica* (WURBURG) LI. – tis čínsky
- *Taxus cuspidata* S. et. Z. – tis japonský

- *Taxus hunnevelliana* REHD. – tis hunnewellov
- *Taxus x media* REHD. – tis prostredný

Tabuľka 1 Systematická charakteristika rodu *Taxus*(podľa Baloglu a Kingston, 1999).

Triviálne názvoslovie	Botanická charakteristika
Tis európsky alebo Tis anglický	<i>Taxus baccata</i> L.
Tis himalájsky	<i>Taxus Wallichiana</i> .
Tis čínsky	<i>Taxus celebica</i>
Tis japonský	<i>Taxus cupsidata</i>
Tis pacifický	<i>Taxus brevifolia</i>
Tis mexický	<i>Taxus globosa</i>
Tis floridský	<i>Taxus floridana</i>
Tis kanadský	<i>Taxus canadensis</i>
	<i>Taxus x media</i>
	<i>Taxus x hunnewelliana</i>

1.3 Výskyt tisú

Tis sa „objavil“ v strednej Európe asi pred 180 miliónmi rokov jurskom období druhohôr, vo štvrtohorách v období jednotlivých glaciálov (zaľadnení) ustupoval na miesta teplejšie a v období interglaciálov sa šírila na miesta, odkiaľ pred tým ustúpila (Bohuš, 1984).

Tis sa pôvodne vyskytuje v severnej časti Pyrenejského polostrova, na Britských ostrovoch, v Nórsku vystupuje po 61°30' s. z. š., na juhu smeruje cez Apeninský a Balkánsky polostrov do Alžírsku, Maroka a Tuniska, na východe zasahuje na Krym, Kaukaz, Malou Áziu sa tiahne do severného Iránu a Sýrie. Rastie v oblastiach s oceánskou klímou (Pagan a Randuška, 1987).

Jeho kedysi veľký, takmer súvislý areál rozšírenia hlavne v stredných horských polohách Európy od Balkánu a Pyrenejí až po Škandináviu a Britské ostrovy je teraz už nesúvislý, obmedzený na niektoré rezervácie, chránené oblasti a národné parky.

V prírode Slovenska sa tis udržal v odľahlých, ťažko prístupných, bralnatých terénoch, hlavne na vápencoch v zóne bučín od Bielych Karpát až po Nízke Beskydy a od Tríbeča až po Slovenský kras (Korpeľ, 1996).

V Európe boli Karpaty oddávna známe výskytom tisu. Z Karpát sa dovážal nielen do južnej Európy, ale aj do Anglicka. V 17. a 18. storočí bol pre tis veľkou pohromou rozvoj baníctva, najmä v oblasti Banskej Bystrice a Starých Hôr. Rozsiahle holoruby v tomto období zasiahli i lesy Veľkej Fatry, a to predovšetkým oblasti Harmanca (Jurčák a Štlamach, 1997).

V oblasti Veľkej Fatry, obzvlášť v jej južnej časti, sa ako podružná drevina v poraste bučín vyskytuje rozptýlene na väčších plochách. Lokality s početnejším výskytom od niekoľkých stoviek až po desiatky tisíc jedincov sú vyhlásené za štátne prírodné rezervácie, ako napr.: Harmanecká tisina, Padva, Tlstá, Korbeľka, Borišov, Madačov, Veľká Skalná, Uňadovo, Plavno a iné (Karasová, 1995).

Podľa Čížovej a Regeca (1993) sa tis vyskytuje len v Slovenskom krase len vo východnej časti územia. Charakteristickými lokalitami preň sú severne exponované skalné bralá, kde sa najčastejšie vyskytuje na vrcholových plošinách a na úpätí brál. Odlišným typom stanovišťa bývajú inverzné polohy tiesňav. Vďaka teplotnej inverzii tis v zádielskej tiesňave zostupuje do nadmorskej výšky 310 m. Charakteristickým porastovým typom sú bučiny a jedľové bučiny štvrtého lesného vegetačného stupňa. Pre zachovanie prirodzeného zmladenia tisu je napriek jeho tieňomilnosti nevyhnutné dostatočné množstvo svetla v podúrovni.

Známou lokalitou jeho výskytu na východnom Slovensku je národná prírodná rezervácia Becherovská tisina. Jeho výskyt je viazaný najmä na extrémne, strmé, balvanité svahy so sklonom 40 – 50° (Lukáčik a Nič, 1995).

Prevažná časť tisu je viazaná na vápencové podložia s priemerne až lepšie živinami zásobenými pôdami, na severne exponované svahy stredne vysokých pohorí, so subatlantickým charakterom klímy (Korpeľ, 1995).

1.4 Použitie tisu

Tis sa používal pre jeho pevné, trvanlivé, a dekoratívne pôsobivé drevo. Už v dobe kamennej sa z neho zhotovovali násady do kamenných sekier, v stredoveku sa zas

používalo na výrobu kvalitných tisových lukov, alebo aj na stavbu domov, prípadne obkladov kráľovských komnát a šľachtických príbytkov. V starovekom Egypte tis považovali za kráľovské drevo. Veľa predmetov nájdených v hrobkách faraónov bolo zhotovených z tisu, najznámejšou z nich je plastika hlavy manželky faraóna Amanemneho III. (asi 1400 rokov pr. Kr.) (Burkovský, 1998).

Predmety vyrobené z tisového dreva sú veľmi kvalitné a v minulosti ho vo veľkej miere používali rezbári pre výrobu dekoračných a úžitkových predmetov. Vyrábajú sa z neho aj barly, vychádzkové palice, palice pre dáždniky, podložky pod poľovnícke trofeje, pohrebné rakvy ako aj nábytok (www.yamadori-bonsai.de).

Taktiež sa môže používať extrakt z voňavého ihličia tisu, ktorý sa využíva ako deodorant, alebo na čistenie. Konáriky a ihličie sa používajú na symboliku niektorých budov a inštitúcií. V minulosti sa ihličie tisu sušilo a používalo na fajčenie v kombinácii s tabakom. Semienka tisu sa v minulosti jedli v menšom množstve aj napriek tomu že, sú jedovaté. (Hansen, 1999).

Ihličie a kôra tisu obsahujú okrem jedovatých alkaloidov aj látku účinnú proti rakovine, ktorá sa nazýva taxol. Taxol sa používa na liečbu rakoviny prsníka a vaječníkov (Filová a Miklášová, 2006).

1.5 Sekundárny metabolizmus látok

Sekundárne metabolity syntetizované a akumulované v rastlinách sa vyznačujú rôznorodosťou chemických štruktúr (Masarovičová, 2002).

Väčšinou sú súčasťou adaptačných procesov pre interakciu rastliny s prostredím. Majú významnú úlohu pri obrane organizmu proti patogénom, hmyzu, ochrane pred UV žiarením, pigmentácii a opelením. Sekundárne metabolity sú produkované iba určitými skupinami organizmov, ako sú rastliny a mikroorganizmy (Demain, 1990).

Biosyntéza sekundárnych metabolitov je časovo obmedzená na určité etapy vývinu rastliny (Masarovičová, 2002).

Sekundárne metabolity boli izolované ako biologicky účinné látky, ktoré našli svoje uplatnenie pri liečení rôznych chorôb, ako aditíva do potravín, alebo ako biopesticídy (Gragg et al., 1999).

1.6 Taxol

V roku 1960 pri veľkoplošnom screeningu zistili pracovníci amerického inštitútu pre výskum rakoviny (*National Cancer Institute*) u myši antileukemický účinok extraktu z kôry pacifického tisu (Valachovič, 1998).

Účinná látka taxol bola prvýkrát popísaná v roku 1971. Na testovanie sa zbierali extrakty z viac ako 35 000 rastlín. Prvý objavený druh, ktorý obsahoval protirakovinové látky a z ktorého boli tieto látky izolované, bol *Taxus brevifolia*, ktorý rastie v miernej oblasti. Boli izolované z kôry tisového dreva. Na produkciu 1 kg taxolu musí byť obetovaných zhruba 3000 stromov, alebo zhruba jeden až dva stromy na jednu liečbu (Hansen, 1999).

Sú rozbehnuté úsilie o syntetizovanie taxolu sú rozbehnuté a zvýšeniu zásob môže napomôcť kultivácia v pletivových kultúrach alebo pestovanie stromov. Klinické skúšky sú limitované vzácnosťou liečiva (Slichenmyer a Van Hoff, 1990).

Dr. Edward M. Croom Jr. z Univerzity v Mississippi zistil, že pre okrasné druhy tisú je primárnym zdrojom taxolu ihličie, zatiaľ čo kôra je zdrojom pre pôvodné druhy tisú. Navyše, zatiaľ čo kôra stromov obsahuje približne 0,01 % taxolu, ihličie okrasných, hybridných druhov tisú (*Taxus x media* "Hicksii") ho obsahuje viac ako 0,02 %. Efektívnym a ekonomickým spracovaním odrezkov sa dosiahol obnoviteľný zdroj taxolu (Hansen, 1999).

Neskôr sa začali zakladať pestovateľské plochy (škôlky), na ktoré sa vysádzali sadenice tisú. Kry (stromčeky) sa každoročne prerezávali, a tak sa pripravili nízke, husté a pevné rastliny, ktoré sú požadované trhom (Slichenmyer a Van Hoff, 1990).

Najväčšia zbierka druhu *Taxus* bola v arboréte – botanickej záhrade Livinga Chadwicka. Dr. L. C. Chadwick a jeho absolvent univerzity vysokoškôlak Raymond A. Keen zhromaždili od roku 1942 viac než 100 odrôd tisú. Hľadali najvhodnejšie odrody *Taxus* s najlepšimi vlastnosťami, aby sa z neho mohli izolovať maximálne množstvá taxolu. Známym pôvodným výrobným systémom – syntézou sa vyrábal predchodca taxolu, 10–deacetylbaaccatin III. Ten bol úspešne používaný na produkciu taxolu, ktorý bol do tej doby identifikovaný ako paclitaxel. Taxol bol oficiálne zapísaný obchodným menom a formulovaný ako liek. Primárny zdroj taxolu 10–deacetylbaaccatin III sa našiel

v obnoviteľnej biomase (vetvičkách a ihličí) v európskom druhu tisu (*Taxus baccata*) a v himalájskom druhu tisu (*Taxus wallichiana*) (Hansen, 1999).

Taxol podporuje formovanie mikrotubúl z tubulínu. Liečivo sa spája s tubulínovými dimérmi, redukuje kritickú koncentráciu tubulínu potrebného na polymerizáciu a zvyšuje úroveň a rýchlosť polymerizácie. Taxol umožní mikrotubulám zhromaždenie v nepriaznivých podmienkach a tieto mikrotubuly sú abnormálne rezistentné k depolymerizácii. Bunky vystavené taxolu majú abnormálnu morfológiu cytoskeletu, čo poukazuje na jeho cytotoxicitu. Tá je pravdepodobne spôsobená mikrotubulami sprostredkovaným prerušením mitózy, bunka v tomto štádiu odumiera (Slichenmyer a Van Hoff, 1990).

Uvedeným mechanizmom odumierajú síce i bunky zdravých tkanív, ale vzhľadom na to, že bunky zhubných novotvarov sa množia omnoho rýchlejšie ako zdravé bunky, preparát prednostne brzdí, alebo zastavuje rast nádoru. Antineoplastický účinok taxolu sa znásobuje schopnosťou i na iných miestach zasahovať do zložitého mechanizmu nekontrolovaného množenia rakovinových buniek, ako napr. ovplyvňuje produkciu *tumor necrosis factor* (TNF) a interleucin-1 atď. (Valachovič, 1998).

V predklinických skúškach vykázal taxol preukázateľnú antineoplastickú aktivitu. Početné bunkové línie a ľudské tumory sú citlivé na taxol. Navyše, klinické štúdie potvrdili, že pacienti s množstvom malígnych nálezov pozitívne reagovali na liečenie taxolom. Taxol je efektívny pri liečbe karcinómov vaječníkov a pravdepodobne aj iných zhubných nádorov (Slichenmyer a Van Hoff, 1990).

1.7 Historický prehľad využívania taxolu

Objavenie biologicky aktívnej látky menom taxol, ktorá bola izolovaná z rastliny *Taxus baccata* a jej historický vývoj používania popísal Hansen (1999) a Valachovič (1998) takto:

1963 – Vzorok z tisu preukázali účinnosť proti bunkám v tkanive. Biochemik Monroe Wall (U.S.A.) sa týmto problémom začal zaoberať.

1966 – Wall izoloval primárnu aktívnu látku a pomenoval ju taxol.

1971 – Wall M., Wani M. a McPhail A. uverejnili štruktúru molekuly taxolu ako komplex diterpénu s oxatánom v hlavnom reťazci a esteru v bočnom reťazci.

-
- 1974** – Taxol sa začal skúšať na zvieratách, kde bol účinný.
- 1977** – Suzan Horowitz zistila, že taxol brzdí replikáciu buniek, indukuje polymerizáciu tubulínu a inhibuje rozkladanie mikrotubúl, čo je činnosť potrebná na dokončenie bunkového delenia.
- 1978** – Taxol preukázal pozitívne účinky v troch oblastiach vrátane rakoviny pľúc transplantovaním z cudzieho tkaniva. Bol vyvinutý v 70-tych rokoch.
- 1980** – Vedci hľadali vhodný spôsob na uchovávanie tejto nerozpustnej drogy.
- 1982** – Taxol bol schválený na použitie ako nový liek.
- 1988** – 30 %-né zlepšenie u pacientov v pokročilom štádiu rakoviny.
- 1989** – Štúdiá taxolu sa rozšírila aj na liečbu iných druhov rakoviny – okrem rakoviny pľúc, aj na rakovinu hrubého čreva, žalúdka, pľúc, prostaty, maternice a iných.
- 1992** – Združenie lekárov v U.S.A. založilo 20 centier na niekoľko rozdielnych druhov rakoviny s pokusom o kombináciu liečby.
- 1992** – Firma Bristol Myers Squibb podala žiadosť o registráciu protinádorového preparátu, obsahujúceho taxol s obchodným označením Paclitaxel[®].
- 1993** – Preparát Paclitaxel[®] je registrovaný vo Švédsku ako v prvej európskej krajine a veľmi rýchlo ho schvaľujú i v ostatných krajinách ekonomicky vyspelého sveta.
- 1996** – Štátny ústav pre kontrolu liečiv (ŠUKL) schvaľuje registráciu taxolu na Slovensku.

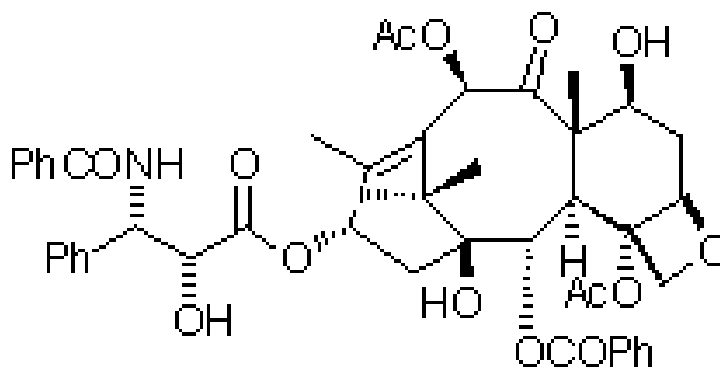
1.8 Mechanizmus účinku taxolu

Taxol je cytotoxický diterpén ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) a ako vidieť na obrázku č. 1, molekula taxolu pozostáva z dvoch odlišných štruktúrnych jednotiek. Prvou je vysoko funkčná diterpénová časť (kruhový systém taxolu) a druhou je substituovaná fenyl-izoserínová strana reťazca.

Primárny mechanizmus účinku taxolu spočíva v tom, že má silný inhibičný účinok na replikáciu bunky, teda má schopnosť stabilizovať mikrotubuly, a tým narušuje rovnováhu medzi tubulínom a mikrotubulami, ktorá je nevyhnutná pre normálne

fungovanie bunky pričom zasahuje do G2/M fázy bunkového cyklu. Tým sa zastavuje rast rakovinových buniek (Kingston, 2005).

Je účinný proti ľudským nádorovým bunkovým líniam prsníka a vaječníkov a používa sa v klinickej chemoterapii (Valachová et al., 2007).



Obr. 1 Chemický vzorec taxolu (Edward, 1996)

1.9 Biotechnológia a produkcia taxolu

Pod pojmom biotechnológie rozumieme technologické postupy vypracované na biologickom základe. V dnešnej dobe sú biotechnologické metódy veľmi využívané a žiadané. Biotechnológie zahŕňajú poznatky z oblasti biochémie, molekulárnej genetiky, rastlinnej fyziológie, mikrobiológie, génového inžinierstva a priemyselných technológií (Filová, 2004).

Biotechnologické postupy ponúkajú možnosť využitia buniek, pletív, orgánov alebo celých organizmov, pre ich rast v *in vitro* kultúre (Colin, 2001).

Komplex metód založených na kultivácii *in vitro* predstavuje v súčasnosti moderný a netradičný systém šľachtenia rastlín (Novák, 1990).

Podľa Nováka (1990) šľachtiteľské biotechnológie vychádzajú z týchto základných princípov:

1. Veľká populácia buniek, z ktorých každá je potenciálnym zdrojom celého rastlinného organizmu, sa dá dlhodobo kultivovať a za kontrolovaných podmienok regenerovať na rastliny. V prípade indukcie procesu somatickej embryogenézy celá rastlina pochádza z jedinej somatickej bunky.

-
2. Bunková kultúra je potenciálnym zdrojom genetickej variability, lebo rastlinné bunky *in vitro* sú geneticky a chromozomálne nestabilné. Genetická nestabilita sa dá prenikavo zvýšiť pri použití mutagénov v kultúre *in vitro*. Bunkové línie časom nestrácajú totipotenciu, čo umožňuje získať výraznú genetickú premenlivosť i u rastlín regenerovaných *in vitro*.
 3. Geneticky rôznorodá bunková populácia môže byť vystavená značným selekčným tlakom (stresové podmienky prostredia, chemické látky, toxíny), ktoré selektujú bunky nesúce špecifickú genetickú zmenu (mutáciu). Niekedy koreluje prejav znaku na bunkovej úrovni s prejavom toho istého alebo iného znaku na úrovni celého organizmu. Znak selektovaný *in vitro* sa prenáša po regenerácii rastlinného organizmu sexuálnou, alebo vegetatívnou cestou na potomstvo v ďalších generáciách.
 4. Populácia odvodená z haploidných buniek (napr. peľových zŕn) zvyšuje pravdepodobnosť zachytenia recesívnych mutácií, ktoré nie sú maskované dominantnými alelami.
 5. Kultúra organizovaných štruktúr rastlinného organizmu (zárodkov alebo meristémov) predstavuje systém udržania vysokej genetickej stability materiálu. Kultivácia organizovaných štruktúr, najmä meristémov, umožňuje hromadne množiť geneticky identické potomstvo (klon) nepohlavnou cestou.

1.9.1 Explantátové techniky

Pod pojmom „kultúra rastlinných explantátov *in vitro*“ treba rozumieť aseptickú kultiváciu izolovaných častí rastlín v umelých (laboratórnych) podmienkach. V experimentálnej praxi to znamená oddeliť zo sterilne vypestovanej alebo povrchovo sterilizovanej rastliny určitú časť, umiestniť ju do sterilného priestoru a kultivovať ju za viac-menej definovaných podmienok (Kováč, 1995).

Pri rastlinnom organizme sa vychádza z toho, že rastliny môžu prechádzať z diferencovaných buniek a pletív do meristematického stavu charakterizovaného intenzívnym bunkovým delením, s následnou cytodiferenciáciou a regeneráciou orgánov, resp. celých rastlín. Totiž každá živá bunka rastlinného organizmu je totipotentná, t.j. obsahuje kompletnú genetickú informáciu, nutnú pre vývin celistvého organizmu. Priebeh morfogénzy vedúci k regenerácii rastlín v podmienkach *in vitro* je

rozhodujúci faktor, ovplyvňujúci cytogenetické vlastnosti získaných jedincov. Genetická kontinuita prejavujúca sa stabilným diploidným karyotypom je zachovaná pri regenerácii rastlín *in vitro* z izolovaných rastových vrcholov (meristémová kultúra), alebo pri odvodnení rastlín zygotných embryí v embryonálnej kultúre (Novák, 1990).

Podľa Semana (1990) explantátové techniky na úrovni *in vitro* prinášajú oproti tradičnému prístupu nasledujúce výhody:

- Možnosť vytvorenia nových genotypov s takou kombináciou vlastností, ktorú nie je možné získať klasickou metódou hybridizácie.
- Schopnosť predbežnej selekcie genotypov so žiadanými znakmi už na určitej úrovni organizácie kultúry *in vitro*.
- Možnosť analýzy prípadných chimér a zníženie ich výskytu pri indukcii morfogénzy z jednej bunky.

Podľa východiskového explantátu rozoznávame tieto kultúry (Böhmová et al., 1988).

- a) Orgánové kultúry – východiskový explantát je diferencovaný orgán, patria sem embryokultúry a peľnicové kultúry.
- b) Pletivové kultúry – východiskový explantát je časť somatického pletiva, napr. koreňová špička, vegetačný vrchol, kvetné časti a podobne.
- c) Bunkové kultúry – východiskový explantát je izolovaná bunka.
- d) Protoplastové kultúry – východiskový explantát je bunka zbavená bunkovej steny.

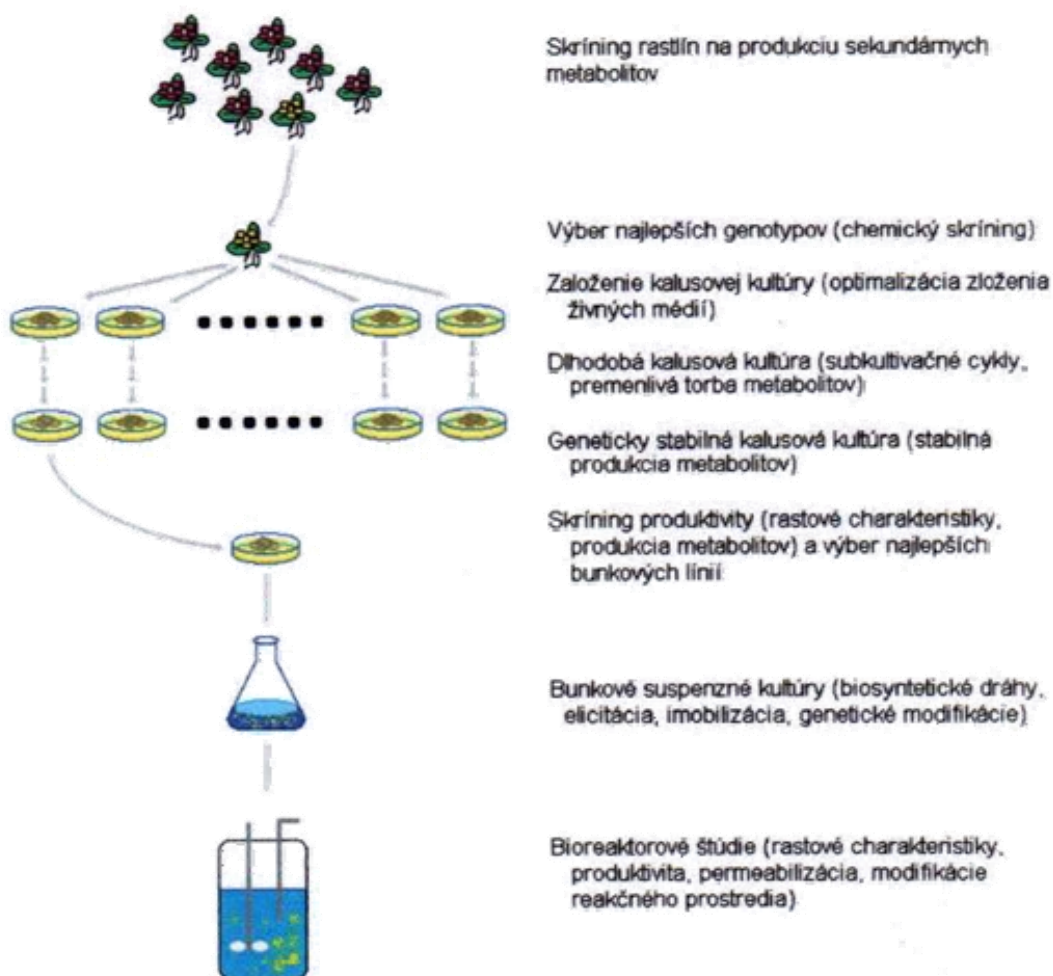
1.9.2 Bunkové kultúry

Pre produkciu sekundárnych metabolitov sú bunkové kultúry dobrou alternatívou. Totižto rastlinné bunky sú biosynteticky totipotentné, čo znamená, že každá bunka v kultúre si zachováva kompletnú genetickú informáciu, a teda je schopná produkovať tie isté chemické látky, ktoré sa vyskytujú v materskej rastline. Výhody týchto technológií pred konvenčnými popísali Rao a Ravishankar (2002) takto:

- je nezávislá od geografických od geografických zmien a rôznych environmentálnych faktorov;
- ponúka definovaný produkčný systém, ktorý zabezpečuje nepretržitú tvorbu produktov rovnakej kvality a výťažku;

- umožňuje produkciu nových zlúčenín.

Celý proces produkcie sekundárnych metabolitov bunkovými kultúrami začína výberom individuálnych rastlín na základe ich produktivity želanvej zlúčeniny. Celý proces je schematicky znázornený na obrázku č. 2.



Obr. 2 Schematické znázornenie produkcie sekundárnych metabolitov bunkovými kultúrami (Pšenáková et al, 2003)

1.10 Získavanie taxolu

1.10.1 Získavanie taxolu zo stromov

Ako vidieť z obrázku 3, pôvodný postup prípravy taxolu izoláciou z kôry pacifického tisu nie je z ekologického ani ekonomického hľadiska dlhodobu perspektívny, pretože dochádza k ničeniu vzácnych stromov. Strobel et al.(1996) vo svojej práci uvádzajú, že na získanie 2 g čistého taxolu je potrebné zničenie dvanástich veľkých stromov a stojí to okolo 10 000 USD.



Obr. 3 Získavanie kôry tisu *baccata*
(www.cem.msu.edu)

Taktiež Hansen (1999) uvádza, že na získanie 1 kg čistého taxolu musí byť obetovaných 3000 stromov alebo jeden až dva stromy na jednu liečbu.

Doposiaľ prírodný taxol ťaží jediná firma Bristol Myers Squibb, ktorá ako jediná má licenciu na získavanie taxolu z kôry prírodného pacifického tisu. Veľká pozornosť sa venuje zakladaniu plantáží, zameraných na produkciu kôry. Aj keď bol taxol zistený i v kôre iných druhov tisu, najperspektívnejšie sa javí objav taxolu v ihličí hybridu *Taxus x media Redhel*, vznikajúcom krížením *Taxus cupsidata* Sieb. Et Zucc. a *Taxus baccata* L., v množstve porovnateľnom s množstvom v kôre pacifického tisu. Ihličie je na rozdiel od kôry obnoviteľný zdroj, pretože tis je schopný intenzívne zmladzovať (Valachovič, 1998).

V praxi bolo navrhnutých niekoľko variantov riešenia tohto problému. Okrem syntézy taxolu a semisyntézy taxolu dosyntetizovaním z prekurzora 10-deacetylbaecatinu, ktoré však z ekonomických dôvodov neznamenali perspektívny spôsob prípravy taxolu, boli to biotechnologické postupy využívajúce ako producentov rastlinné, resp. mikrobiálne bunky (Kingston, 2005).

1.10.2 Enzymatická semisyntéza

Biosyntéza protirakovinovej drogy Taxol z *Taxus brevifolia* a enzýmy spojené s touto cestou boli v podstate objasnené. Veľa génov kódujúcich tieto enzýmy boli

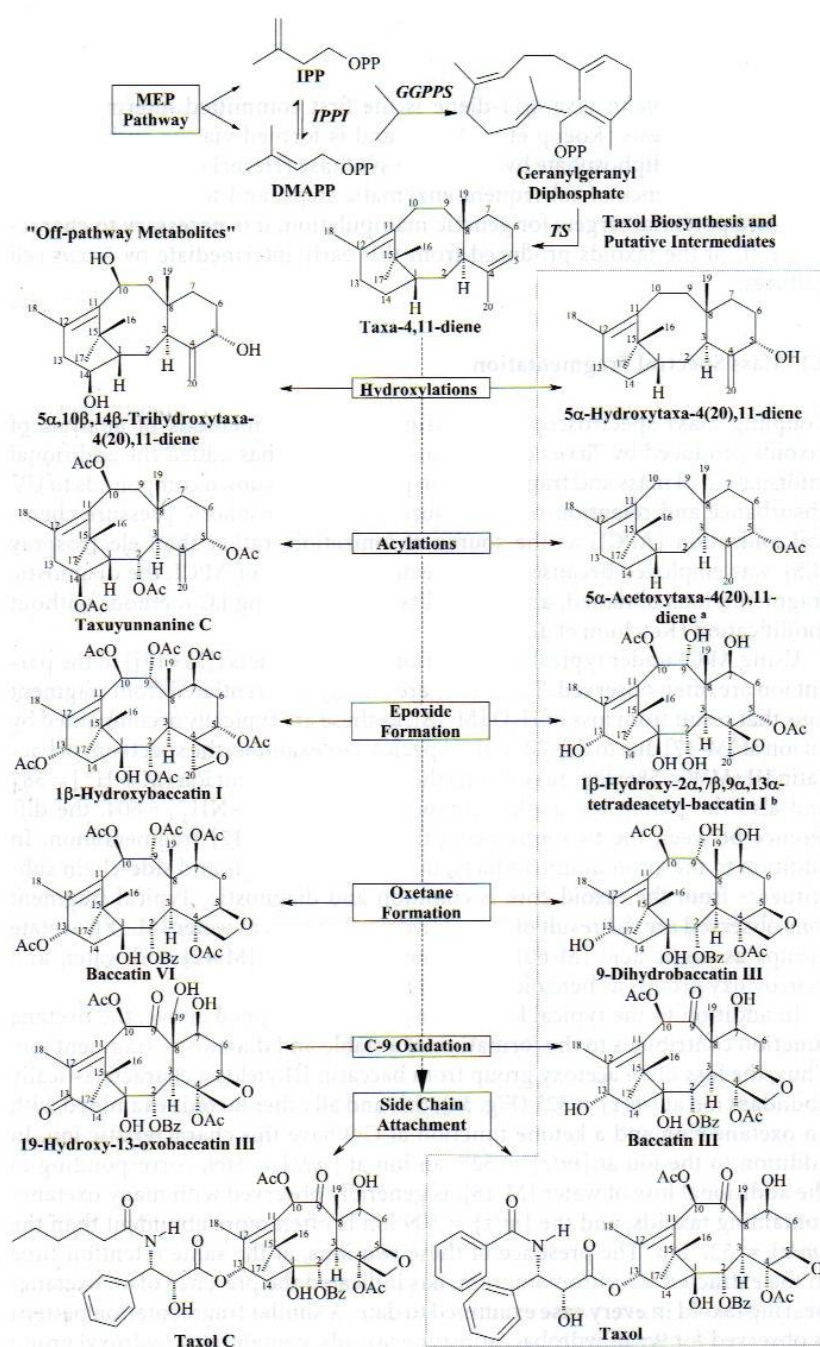
charakterizované a klonované. Expresia týchto enzýmov v baktériách, kvasinkách, hubách alebo rastlinách a vývoj v adaptovaných bioreaktoroch môže znamenať spôsob, ako riešiť zásobovací problém účinnej drogy Taxol (Frense, 2007).

1.10.3 Semisyntéza taxolu

V kôre a ihličí tisov sa popri taxole nachádza širšia škála taxánových derivátov, štruktúrou blízkych taxolu. Z niektorých sa dá taxol pripraviť troj- až štvorstupňovou syntézou realizovateľnou v priemyselných objemoch. V súčasnosti najvýznamnejší taxánový derivát používaný na semisyntézu finálnej substancie 10-deacetylbaaccatin III, sa nachádza v zaujímavom množstve v ihličí európskeho tisu (Valachovič, 1998).

Taxol sa vyrába vo veľkom množstve semisyntézou z prekursoru baaccatin III (Kingston, 2005).

Celá syntéza taxolu a jeho analógov začína z 10-deacetylbaaccatinu III, ktorý musí byť zabezpečený v C7, a C10 pred acyláciou, ktorá prebehne na C13 pozícii. Syntéza taxolu je schematicky znázornená na obrázku 4.



Obr. 4 Biosyntéza taxolu primárnym metabolizmom (Ketchum a Croteau, 2006).

1.10.4 Produkcia taxolu pomocou húb a mikroorganizmov

Pôvodne sa predpokladalo, že primárnym zdrojom taxánov je ihličie a vodivé pletivo floém v podkôre stromov *Taxus* spp.

Prvým dôkazom, že aj iné organizmy ako rastlinné bunky dokážu produkovať taxány, bolo objavenie mikroorganizmu *Taxomyces andreanae* z triedy *Hyphomycetes*. Endofytická huba bola izolovaná z *Taxus brevifolia* a je schopná produkovať taxoidné metabolity kultiváciou v semisyntetickom kvapalnom médiu. Produkcia taxolu bola zaznamenaná okrem endofytu *Taxomyces andreanae* aj u *Periconia* spp., endofytu *Torreya grandifolia* a *Seimatoantlerium nepalense*, endofytu z Himalájskeho tisú *Taxus wallichiana*. Taktiež baktérie rodu *Erwinia*, izolované z *Taxus canadensis* produkujú taxol a príbuzné taxány kultiváciou na jednoduchom semisyntetickom, alebo syntetickom médiu (Valachová et al., 2007).

1.10.5 Produkcia taxolu bunkovými kultúrami

Veľká pozornosť je venovaná produkcii taxolu, resp. 10-deacetylbaecatinu III biotechnologickou cestou z izolovaných buniek alebo pletív suspendovaných v živných roztokoch v optimálnych podmienkach (Valachovič, 1998).

Podľa Frenseho (2007) je tisová bunková kultúra považovaná za sľubný nástroj k produkcii taxolu, pričom jej produkcia bola prvýkrát popísaná Christenom a neskôr patentovaná v roku 1991 (Guo et al., 2006).

Pokrok bol spravený v rámci vzrastajúceho zisku taxolu v kultúre, ktorá bola obohacovaná prekurzormi a cukrami, alebo použitím elicítov (*stimulátorov*), ako metyljasmonát, hubové kultúry, vanadylsulfát a chytosan (Guo et al., 2006).

Štúdie optimalizácie množstva produkcie ukázali rozšírený obsah taxolu rôzne spracovaných tisových bunkových kultúr, porovnávaných s kontrolou. Koncentrácia taxolu v rastlinných bunkách dosiahla pridaním metyljasmonátu približne 0,5 % hmotnosti sušiny. Metyljasmonát indukuje zvýšenú reguláciu génov sekundárnych metabolitov špecificky zapojených pri strese, mechanickom poškodení a patogénnych situáciách (Frense, 2007).

Akumulácia taxolu v bunkách vedie k spätnému potlačeniu a degradácii produktu. Preto *in situ* odstránenie taxolu zo suspenzných kultúr je nevyhnutné pre zvýšenie produkcie. Bol vytvorený perfúzný bioreaktor zahŕňajúci jednoduché a efektívne bunkové separačné nástroje. Vonkajší rad zahŕňajúci polymerické živice extrahuje priebežne sekundárne metabolity. Stabilná bunková separácia bola dosiahnutá s *E.*

californica suspenznými bunkami, používanými ako model biologického systému. Štúdie s inými rastlinnými druhmi museli byť riadené; zdalo sa, že predbežné vzorky vykonané s *Nicotiana tabaccum* predbežne potvrdzujú aplikovateľnosť bioreaktora na bunkovú suspenziu (Frense, 2007).

Hoci doteraz bolo preskúmaných veľa druhov tisu pre produkciu taxolu použitím rastlinných bunkových kultúr a dosiahol sa značný úspech, stále jej komerčné využitie je limitované z dôvodu nízkej produkcie a z nestáleho získavania produktov, rovnako ako produkčnej cene. Preto pre komerčné použitie taxolu je potrebná vysoká ziskovosť taxolu a rýchly rast bunkových línií. Toto môže byť splnené požitím bunkových selekcií v kombinácií so strednou mierou optimalizácie, elicitácie a optimalizácie extrakčných procesov (Guo et al., 2007).

V tabuľke 2 je možné porovnať produkciu taxolu za pomoci bunkovej kultivácii vo fľaši a v bioreaktore.

Tabuľka 2 Produkcia taxolu vyprodukovaná na základe bunkovej kultivácie (Frense, 2007).

Bunková línia	Produkcia (mg . l ⁻¹ . deň ⁻¹)
Vo fľaši	
<i>T. baccata</i>	1.02
<i>T. canadensis</i> (C93AD)	1.68
<i>T. chinensis</i>	2.24
<i>T. chinensis</i>	3.64
<i>T. mairei</i>	4.76
<i>T. cupsidata</i>	5.32
<i>T. media</i>	7.86
<i>T. canadensis</i>	9.75
V bioreaktore	
<i>T. cupsidata</i>	0.11
<i>T. x media</i> var. Hicksii	0.31
<i>T. media</i>	0.53
<i>T. wallichiana</i>	0.75
<i>T. cupsidata</i>	1.10
<i>T. chinensis</i>	1.50
<i>T. chinensis</i> var. <i>Mairei</i>	1.52
<i>T. yunnanensis</i>	1.90
<i>T. baccata</i>	2.71

1.11 Ekofyziologická charakteristika tisú

1.11.1 Fotosyntéza

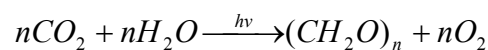
Rastliny sú otvorené systémy, v ktorých dochádza k neustálej výmene hmoty (CO_2 , O_2 , H_2O , minerálnych látok), energie a informácií s okolitým prostredím. Medzi vlastné metabolické procesy v rastlinách patria reakcie anabolické (pri ktorých dochádza k výstavbe štruktúr) a katabolické (spojené s odbúraním a rozkladom látok).

Fotosyntéza zahrňuje fotochemické procesy, ktoré prebiehajú za prítomnosti svetla, enzymatické procesy nevyžadujúce svetlo a procesy difúzie, ktoré umožňujú výmenu oxidu uhličitého a kyslíka medzi chloroplastmi a vonkajším vzduchom (Larcher, 1984; Procházka et al., 1998).

Z pohľadu existencie života ju považujeme za najdôležitejší proces na zemi (Procházka et al., 1998).

Prevažná väčšina rastlín patrí medzi autotrofné organizmy, kde ich zdrojom energie je žiarenie (fotoautotrofia), alebo niektoré organické látky.

Fotosyntézou označujeme veľký súbor reakcií, ktoré sa často vyjadrujú nasledovnou všeobecnou rovnicou:



kde $h\nu$ je kvantum slnečnej energie.

Uvedený vzťah je treba chápať ako názorné vyjadrenie súhrnu všetkých reakcií, kedy dochádza k vzniku organických látok $(\text{CH}_2\text{O})_n$ a k uvoľňovaniu molekulárneho kyslíka O_2 , a to z oxidu uhličitého (CO_2) a vody (H_2O) (Procházka et al., 1998).

1.11.2 Fotosyntetické štruktúry

1.11.2.1 Chloroplasty

Podľa Michalíka (1987) je fotosyntéza jeden z najdôležitejších biologických procesov v prírode a prebieha v špecializovaných bunkových organelách nazývaných chloroplasty, ktoré sa nachádzajú najmä v mezofylových bunkách zelených listov.

Chloroplast je najmenšia štrukturálna i funkčná jednotka, ktorá je schopná i po izolácii absorbovať žiarenie, fixovať CO_2 a zabudovávať uhlík do sacharidov (Procházka et al., 1998).

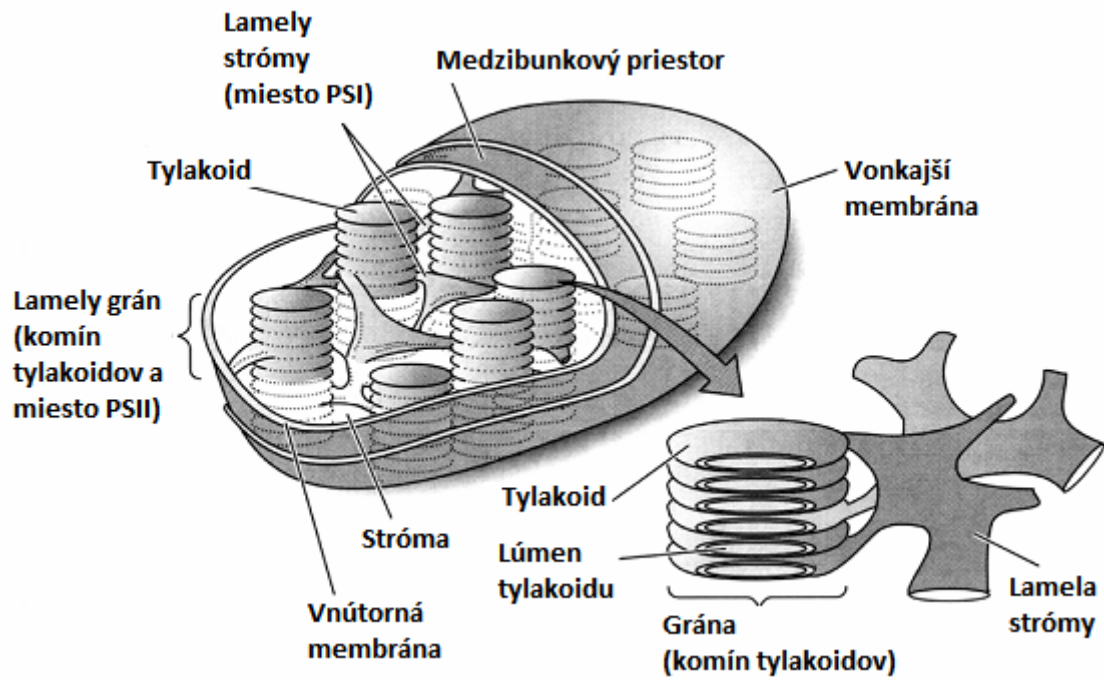
Chloroplasty sa skladajú z vnútorného systému membrán, ktorý je obalený vonkajšou lipoproteínovou membránou (Michalík, 1987).

Chloroplasty vyšších rastlín majú dve obalové membrány rôznych vlastností. Selektívne prenášače pre výmenu látok medzi chloroplastom a cytoplazmou má však len vnútorná z nich (Šetlík et al. 2010).

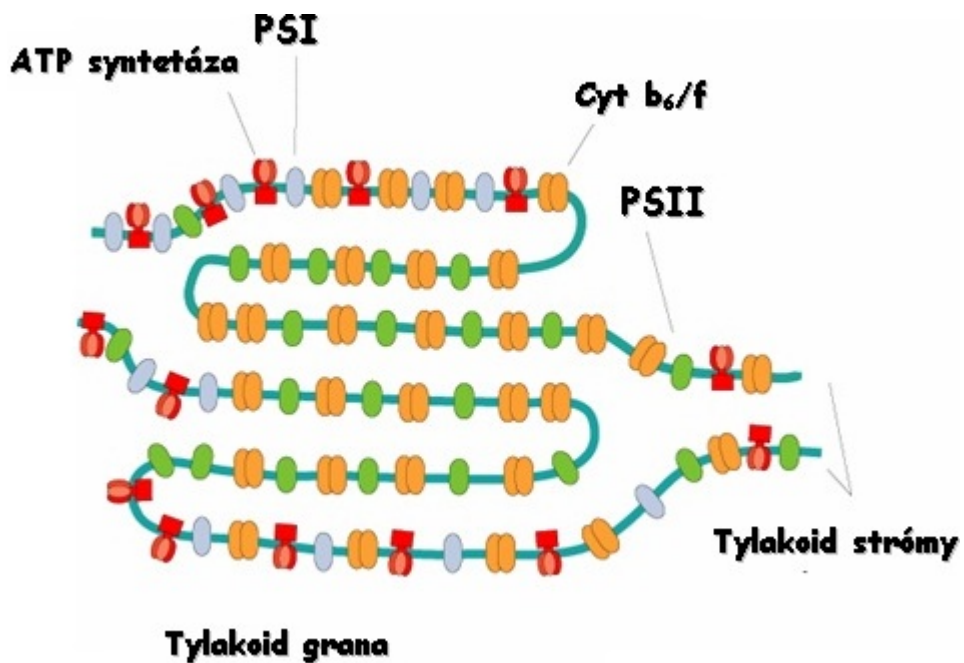
Pod dvoma obalovými membránami chloroplastu sa nachádza vnútorné amorfné médium, ktoré sa nazýva stróma. Typickými útvarmi chloroplastov sú tylakoidy predstavujúce rozprestreté systémy vnútornej membrány podobné plochým mechúrikom (tylakoidy strómy), alebo vzájomne na seba natlačených resp. navrstvených tylakoidov nazývaných graná (Procházka et al., 1998).

Podľa Procházka et al. (1998) v týchto tylakoidoch je možné rozlíšiť malé útvary nazývané fotosystém I (PSI), zatiaľ čo väčšie častice na vonkajšom povrchu týchto tylakoidov sa považujú za ATP-syntetázy a ďalej štruktúry svetlozberného pigmento-proteínového komplexu fotosystému II (PSII). Zvyknú byť detekované ako veľké častice na stlačených membránach granálnych tylakoidov.

Graná umožňujú priestorové rozdelenie PSI, ktorý sa nachádza v rozvetvených membránach a PSII, ktorý sa nachádza v natlačených membránach (Voet a Voetová, 1995). Taktiež dôvodom môže byť aj to, že PSI využíva žiarenie o nízkej energii a pri blízkom kontakte by PSI mohol preberať aj excitóny z PSII.



Obr. 5 Schématické znázornenie chloroplastu vyšších rastlín (Krúlová 2007).



Obr. 6 Topologické rozmiestnenie jednotlivých makromolekulárnych komponentov na tylakoidoch chloroplastu (Voet a Voetová, 1995).

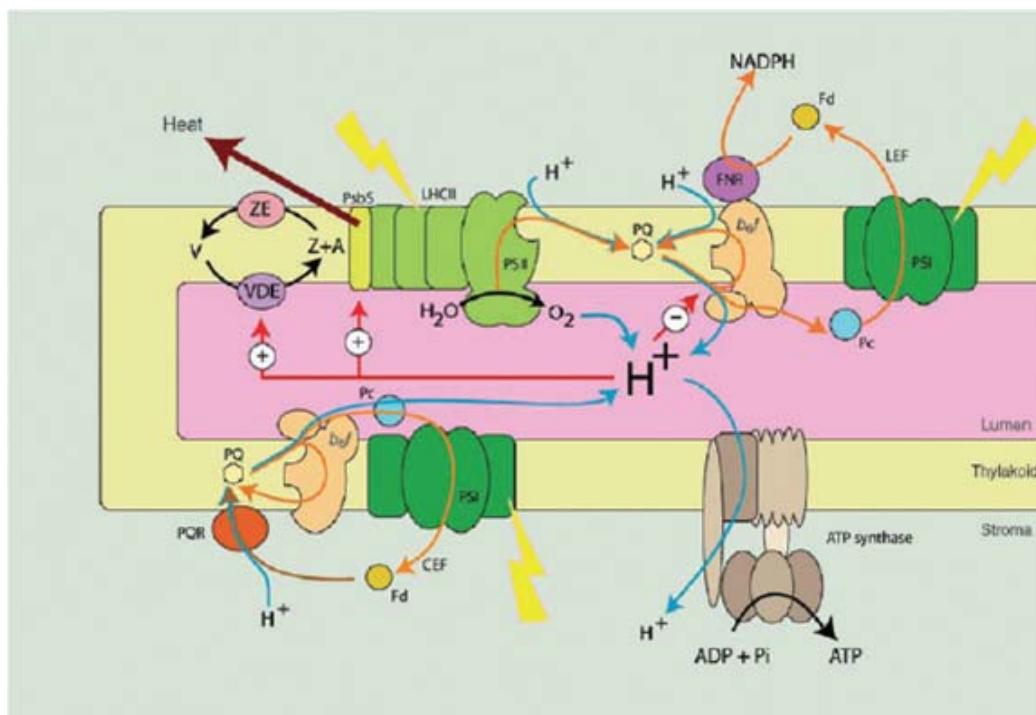
Membrána tylakoidov je zložená z lipidovej dvojvrstvy, v ktorej sú uložené pigmento-proteínové komplexy (PPC). Hlavnou zložkou membrány sú galaktolipidy a fosfolipidy. Absorpciu slnečného žiarenia a jeho prenos zabezpečujú PPC, ktoré sú tvorené chlorofylom a karotenoidmi viazanými na bielkoviny (Procházka et al., 1998).

Tam začína premena energie rozdelením nábojov a pokračuje prenosom elektrónov, presunmi protónov a syntézou ATP. Prenosy elektrónov u oxygénej fotosyntézy navodzujú oxidáciu vody, ktorá je taktiež viazaná na membránu.

K pohlteniu excitónu reakčným centrom však dôjde jedine vtedy, ak je primárny donor schopný excitácie. To znamená, že jeho chlorofyl je v základnom stave a má ten elektrón, ktorý prechádza do vybudeneho stavu a prenáša sa ďalej na primárny akceptor, takže chlorofyl sa oxiduje (Šetlík et al., 2010).

Konečnými produktmi reakcií katalyzovaných osvetlenými tylakoidmi je O_2 , $NADPH + H^+$ a ATP. Konverzia a uchovanie energie v chloroplastoch úzko súvisí s chlorofylom viazaným na bielkoviny, ktoré pohlcujú energiu žiarenia a menia ju na energiu redoxnú (Procházka et al., 1998).

V tylakoidnej membráne sa energia slnečného žiarenia premieňa na redukčný potenciál elektrónov. Takto sa redukuje $NADP^+$ na $NADPH + H^+$, a taktiež sa umožní tok elektrónov, ktorého dôsledkom je presun protónov H^+ a syntéza ATP.



Obr. 7 Schématické znázornenie presunu elektrónov (oranžové šípky) a protónov (modré šípky) (Baker et al., 2007).

Enzým Rubisco (ribulózo-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza) obsiahnutý v plazmatickom oddelení chloroplastu viaže oxid uhličitý na akceptor ribulózo-1,5-bisfosfát (RuBP). Rozštípením produktu karboxylácie vzniknú dve molekuly kyseliny 3-fosfoglycerovej (3-PGA), ktoré sa redukujú na dve triózy. Tie potom slúžia ako výsledný produkt chloroplastových reakcií a taktiež vstupujú do Calvinovho cyklu, kde regenerujú akceptor RuBP. Pri karboxylácii RuBP a redukcii 3-PGA sa oxiduje redukovaný prenášač $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a hydrolyzuje sa energiou bohatá väzba ATP. Oboje dodávajú svetelné fotochemické reakcie fotosyntézy (Šetlík et al. 2010).

1.11.2.2 Fotosyntetické pigmenty

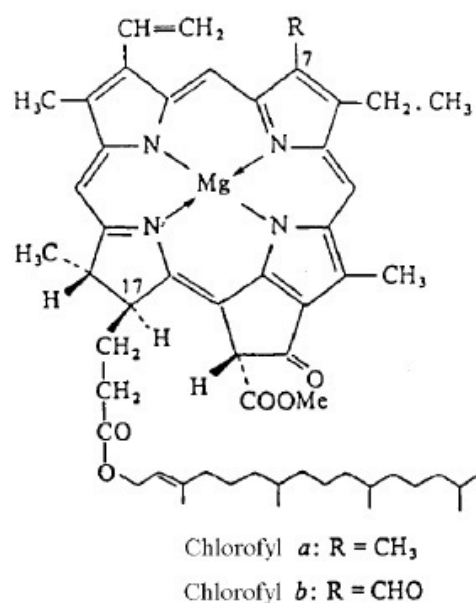
Primárnou požiadavkou pre priebeh fotosyntézy je absorpcia žiarenia v chloroplastoch. Stupeň využitia žiarenia je závislý na koncentrácii chlorofylu, alebo presnejšie na koncentrácii fotosynteticky aktívnych pigmentov (Larcher, 1984).

Podľa Šetlík et al. (2010) patria všetky farbivá fotosyntetických membrán do dvoch skupín: tetrapyroly s uzavretým kruhom sú chlorofyly, s kruhom otvoreným sú fykobilíny. Polyizoprény sú karotenoidy, ktoré sa delia na uhľovodíkové karotény a kyslíkaté xantofyly.

Chlorofyly

Základom štruktúry chlorofylu sú porfyríny, čo sú tetrapyroly vzájomne pospájané metínovými mostíkmi ($-\text{CH}=\text{}$) a s chelátovo viazaným Mg^{2+} . Pokiaľ horčík v kruhu chýba, nazývame tieto pigmenty feofytíny, s príslušným písmenom chlorofylu, z ktorého je feofytín odvodený (Šetlík et al., 2010; Procházka et al., 1998).

Hydrofilný charakter porfyrínu je do značnej miery prekrytý lipofilným



Obr. 8 Štruktúrny vzorec chlorofylu a a b.

charakterom fytolu, ktorým je esterifikovaný zvyšok kyseliny propiónovej na C7 uhlíku. Rozdiel medzi chlorofylom *a* a chlorofylom *b* je len v rozdielnych skupinách na C3 uhlíku (pyrolový kruh II). Celkovo prevláda lipofilný charakter chlorofylu, ktorý je rozpustný v nepolárnych organických rozpúšťadlách. Chlorofyl *a* je nevyhnutný pre vlastnú premenu energie vo fotosyntéze. Všetky ostatné pigmenty majú len pomocnú funkciu, pretože zachytávajú dopadajúce slnečné žiarenie a energiu svojho excitovaného stavu prenášajú na chlorofyl *a* (Procházka et al., 1998).

Karotenoidy

Karotenoidy sú terpenoidy, rozmanité v podrobnostiach štruktúry molekúl a spektier pri zachovaní jednotnej stavebnej schémy a základných spektrálnych vlastnostiach. Sú to buď uhl'ovodíky, karotény alebo kyslíkaté zlúčeniny a z nich odvodené xantofyly. Ich základný skelet obsahuje 40 atómov uhlíku a je postavený z ôsmich izoprenových jednotiek (Šetlík et al., 2010).

Z karoténov sa v listoch vyšších rastlín najčastejšie vyskytuje β -karotén, z xantofylov violaxantín, luteín a zeaxantín. Taktiež sú čiastočne viazané na bielkoviny. Sú to doplnkové pigmenty, ktoré predovšetkým chránia fotosyntetický aparát pred nevratnou fotooxidáciou (Procházka et al., 1998).

Pred fotooxidáciou chránia najmä β -karotény a to tak, že bránia tripletov deexcitáciou energie. Xantofyli majú významnú úlohu v anténach a to ako svetlozberné farbiva a ako regulátory účinnosti prenosu excitácie z antény do reakčného centra fotosystémov (Šetlík et al., 2010).

Všetky fotosyntetické farbivá sú lokalizované v chloroplastoch, a to výhradne v membránach vo forme PPC. V tylakoidných membránach sa nachádzajú všetky chlorofyly a prevažná časť karotenoidov. Membrány plastidov obsahujú karotenoidy, a to asi 0.9 % zo sušiny chloroplastu. Obalové membrány chloroplastov sú tmavo žlté, pretože obsahujú karotenoidy, hlavne violaxantín, zatiaľ čo v tylakoidoch prevláda β -karotén. Karotenoidy obsahujú obe obalové membrány (Procházka et al., 1998).

1.11.3 Vplyv faktorov prostredia na fotosyntézu

Závislosť rýchlosti fotosyntézy na vonkajších podmienkach je výsledkom závislosti aktivity jednotlivých parciálnych pochodov (Šetlík et al., 2010).

Každý z týchto dielčích pochodov je ovplyvňovaný vnútornými a vonkajšími faktormi a môže limitovať výťažok celého procesu fotosyntézy (Larcher, 1984).

Fotosyntéza môže byť ovplyvňovaná vonkajšími i vnútornými faktormi medzi ktoré patria svetlo, CO₂, teplota a iné. Medzi vnútorné faktory môžeme zaradiť anatomická stavba listu, obsah chlorofylu a ďalšie (Procházka et al., 1998).

1.11.3.1 Závislosť na svetelných podmienkach

Závislosťou na ožiarení resp. závislosťou na svetelných podmienkach sa zaoberal už aj Mitchell (1998) vo svojej práci kde porovnával dva druhy tisu, *Taxusu brevifolia* a *Taxus baccata*.

Taxus brevifolia je tieňomilný dvojdomý druh, ale do akej miery sa samčie a samičie rastliny dokážu prispôbiť po stránke fyziologickej a morfolologickej na meniace sa svetelné podmienky, nie je dostatočne známe. Škodlivé účinky slnečného žiarenia na fotosyntetický systém môžu byť zmiernené zmenou po fyziologickej a morfolologickej stránke. Mitchell (1998) skúmal pohlavno-špecifické zmeny na ožiarenie medzi samčiami a samičími rastlinami *Taxus brevifolia* pestovaných na slnku a v tieni. Taktiež študoval konkrétne druhové zmeny na *Taxus baccata* a porovnával ich s reakciami rastlín *Taxus brevifolia*. Porovnával fyziologickú aklimatizáciu na fluorescenciu chlorofylu *a*, fotosyntézu, transpiráciu, vodný režim a prieduchovú vodivosť. Morfologické zmeny na vysoké žiarenie stanovoval z merania listovej plochy a distribúcie prieduchov listov vyrastených na slnku a v tieni.

Je známe, že pri zvyšovaní ožarovania v tylakoidov sa zvyšuje okamžitá koncentrácia excitácie, ale súčasne klesá počet otvorených reakčných centier, v ktorých môže byť excitácia účinne premenená. Preto sa s rastúcim žiarením znižuje účinnosť premeny pohlteného žiarenia, a táto energia sa premení na teplo alebo fluorescenciu chlorofylu (Šetlík et al., 2010).

Taktiež reakcia na silné žiarenie je u rastlín spojená s reorganizáciou fotosystému PSII a jeho svetlozbernej antény. Zvyšuje sa množstvo PSII v dôsledku väčšieho počtu reakčných centier a požiadavky udržania vysokej rýchlosti elektrónového transportu (Park et al., 1997; Bailey et al., 2001).

Mitchell (1998) zistil, že samčie i samičie rastliny *Taxus brevifolia* pestované v rovnakých svetelných podmienkach sa výrazne nelíšili pokiaľ išlo o meranie fyziologických charakteristík, vrátane rýchlosti fotosyntézy. Rovnako sa nelíšili morfológické znaky, ako je dĺžka či hrúbka ihlíc alebo listová plocha. Avšak zistil rozdiely v *Taxus brevifolia* pestovaných na slnku a v tieni. Rozdiely boli signifikantne vyššie vo vzorkách rastlín odobraných z tieňa a to vo fotochemickej účinnosti, základnej fluorescencie a variabilnej fluorescencie, ako vo vzorkách odobratých z rastlín na slnku. To poukazuje na skutočnosť, že rastliny rastúce v tieni mali viac pigmentov v PSII, lepšie otvorené reakčné centrá a tým lepšiu fotochemickú účinnosť a boli menej náchylné na fotoinhibíciu.

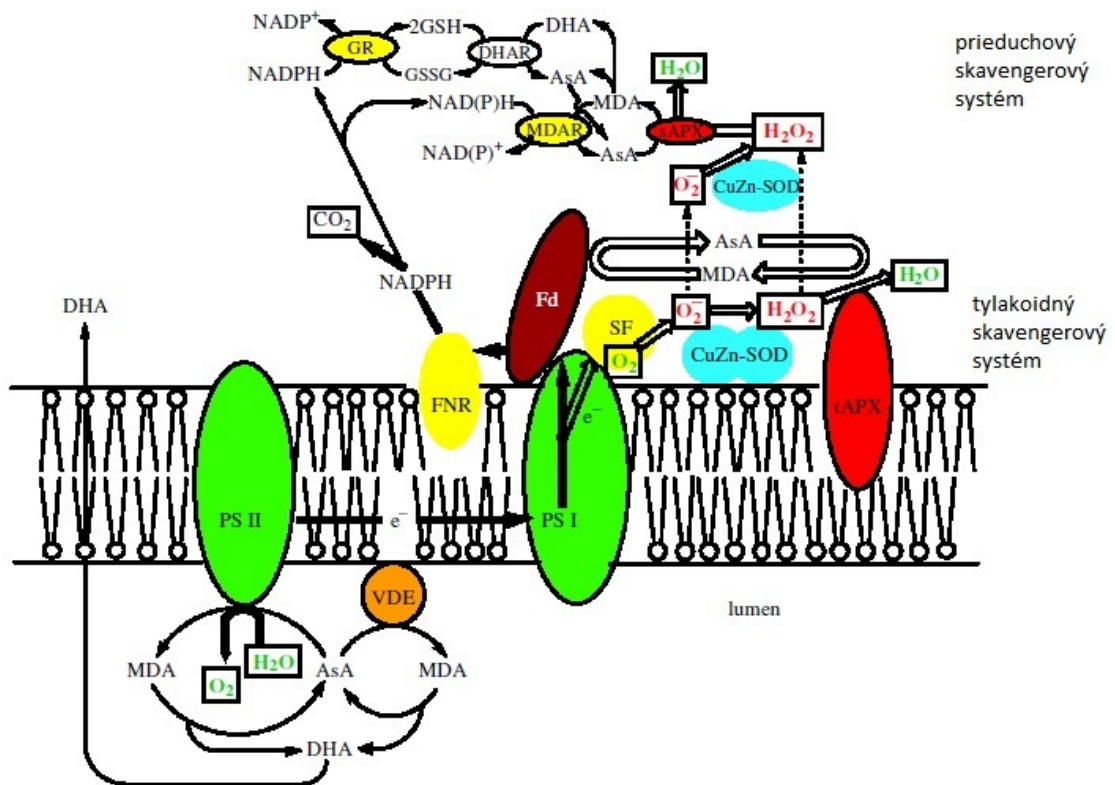
Príčinou poškodenia označovaného ako fotoinhibícia je inaktivácia PSII spôsobená modifikáciou aminokyselín v bielkovine D1. Pretože nie je možná výmena len poškodenej aminokyseliny, musí byť najprv celkom rozložený proteín D1, potom nanovo syntetizovaný a znova vložený ako súčasť PSII. Odhaduje sa, že týmto procesom sa znižuje fotosyntéza až o 15 % (Procházka et al., 1998).

1.11.3.2 Závislosť na ročnom období

Rastliny rastú pri rôznych svetelných a teplotných podmienkach, ktoré sa môžu výrazne meniť počas vegetačného obdobia aj medzi jednotlivými vegetačnými rokmi. Ako sa menia podmienky, mení sa i rovnováha medzi absorpciou svetelnej energie a fixáciou CO₂. Ak je znížená produkcia asimilátov prostredníctvom Calvinovho cyklu, dochádza k zvýšeniu tvorby reakčných foriem kyslíka (ROS), ktoré sú pre metabolizmus bunky toxické. Ak ROS nie sú vychytávané detoxikačným metabolizmom, tak atakujú komponenty chloroplastov, ako sú bielkoviny a fotosyntetické pigmenty. Pokiaľ nedochádza k reparácii poškodených miest, chloroplast stráca svoju funkčnosť a teda dochádza k fotodeštrukcii a bunka zaniká. Rastlina má niekoľko obranných mechanizmov, ktoré bránia fotodeštrukcii (Tanaka, 2007).

Jedným zo spôsobov je prísna kontrola veľkosti svetlozbernej antény, ktorá reguluje množstvo svetla a energie absorbovanej rastlinou (Anderson, 1986; Melis, 1991).

Pri vysokých dávkach žiarenia dochádza k zníženiu syntézy pigmento-proteínových komplexov, čo vedie k tvorbe fotosystému s menšou anténou. Okrem toho môžu rastliny disipovať absorbovanú svetelnú energiu, ktorú nie je schopný fotosyntetický mechanizmus využiť. Táto nadbytočná svetelná energia je z reakčného centra odvádzaná napr. vo forme tepla. Rastliny využívajú rôzne mechanizmy na vyrovnanie reakcií v reakčných centrách vyvolaných nadmerným žiarením. Napríklad elektróny vyprodukované pri oxidácii vody sú prenesené do molekuly O_2 za vzniku O_2^- , ktorý je neskôr konvertovaný na vodu enzýmami superoxiddismutázou (SOD) a askorbátperoxidázou (ASP) (tzv. cyklus voda-voda) (Tanaka, 2007).



Obr. 9 Schematické znázornenie cyklu voda-voda v chloroplaste, znázorňujúci fotoredukciu z dioxidu na superoxid (Asada, 2000).

Týmto spôsobom môžu rastliny spotrebovať a využiť ekvivalentne znížený nedostatok CO_2 , najmä v prípadoch uzatvorenia prieduchového aparátu. Spoločne tieto

mechanizmy umožňujú rastline fotosyntetizovať za rôznych podmienok prostredia. Významným limitujúcim činiteľom, najmä pre fotosyntézu stálezelených rastlín a ihličnanov je vplyv chladu a mrazu. Napríklad, v podmienkach mrazu sa musia rastliny vyrovnávať s tvorbou extracelulárneho ľadu, čo vedie k ťažkej dehydratácii bunky (Goldstein a Nobel, 1994).

Ako dôsledok tohto tuhnutia sa mení zloženie lipidovej membrány, koncentrácia cukrov a taktiež sa dramaticky menia niektoré špecifické metabolity vrátane bielkovín brániacich zamrznutiu (tzv. *anti-freezing proteins*). Okrem týchto zmien sa rastliny vyvinuli špecifické obranné mechanizmy, brániace fotosystém pred účinkom mrazu. Mráz môže spôsobiť úplné uzavretie prieduchov a tak úplné zastavenie výmeny plynov, inaktiváciu enzýmov Calvin-Bensonovho cyklu, pričom zachytávanie svetelnej energie pigmento-proteínovými komplexami pokračuje. Tieto podmienky predstavujú hrozbu pre prežitie buniek, pretože prebytok energie vedie k produkcii tripletového chlorofylu a tvorbe ROS (Asada, 2000).

Tanaka (2007) robil výskum na 8 m vysokých stromoch *Taxus cuspidata*. Zimné vzorky zhromaždil v mesiacoch január a február, letné vzorky boli odobraté od marca do júla. Meral fluorescenciu chlorofylu, a to maximálnu fotochemickú efektivitu PSII (F_v/F_m), počiatočnú fluorescenciu na začiatku svetelného pulzu (F_0) a maximálnu fluorescenciu (F_m). Taktiež pozoroval morfológické zmeny, ako sú zmeny štruktúry a lokalizácie chloroplastov.

Ultraštruktúra a lokalizácia chloroplastov je dobre známa, pričom premiestnenie chloroplastov v intracelulárnom priestore je funkčnou odpoveďou najmä na zmenu žiarenia. Toto premiestnenie slúži na kontrolu absorpcie svetelnej energie, čo je dôležitým mechanizmom chrániacim fotosyntézu pred fotoinhibíciou (Ivanov et al., 2002).

Pri porovnávaní letných a zimných ihlíc Tanaka (2007) došiel k záverom, že letné ihlice mali veľkú vakuolu uprostred zväzku buniek a chloroplasty sa nachádzali v blízkosti plazmatickej membrány. Štruktúry grán boli dobre vyvinuté, čo naznačuje, že v lete majú chloroplasty pravidelný tvar a sú lokalizované v bunkách. V porovnaní s letnými ihlicami, chloroplasty v zimných ihliciach mali zmenenú morfológiu. Väčšina chloroplastov bola opuchnutá a zhromaždená v centre bunky. Ich obaly boli kľukaté a úzko spojené s okolitými chloroplastmi a boli z väčšej miery chránené od cytoplazmatického priestoru. Žiadne iné významné rozdiely neboli zaznamenané.

Pri meraní maximálnej fotochemickej aktivity (F_v/F_m) medzi letnými a zimnými ihlicami aklimatizovanými na laboratórne podmienky taktiež neboli zistené žiadne rozdiely čo naznačuje, že pozorovaný nárast (F_v/F_m) bol závislý na teplote. Tok elektrónov PSII bol v zimných ihliciach o 50 % nižší ako u ihlíc rastlín pestovaných v skleníku, čo poukazuje na to, že i v zimných ihliciach je udržiavaný PSII. Avšak po 1 h aklimatizácii pri 20°C bol tok elektrónov porovnateľný s hodnotami dosiahnutými z rastlín pestovaných v skleníku. Avšak fotochemická aktivita v zimnom období sa môže líšiť v rôznych regiónoch (Tanaka, 2007).

1.11.3.3 Závislosť na koncentrácii CO₂

V dôsledku priemyselnej činnosti sa neustále zvyšuje koncentrácia CO₂ v atmosfére. V súčasnej dobe je veľa výskumov zameraných na to, ako rastliny rastú v tomto meniacom sa prostredí a následne ako budú ovplyvňované procesy výmeny plynov medzi listom a prostredím. Avšak výsledky sú rozporuplné, pričom nie je jasné, ako zvýšená dlhodobá koncentrácia CO₂ má účinok na výmenu plynov. Fotosyntetická aktivita sa zvyčajne zvýši, keď sa zvýši okolitá koncentrácia CO₂, ale zlepšenie sa pohybuje medzi štúdiami od 0 po viac ako 200 %. Výhonky pestované vo zvýšenej koncentrácii CO₂ často vykazujú klesajúcu aklimatizáciu na svetelné podmienky a samotnú efektívnosť karboxylácie (Roberntz a Stockfors, 1998).

Niektoré štúdie poukazujú na to, že zvýšenie CO₂ ovplyvňuje rytmus rastu rastlín tým, že vykoná zmenu v načasovaní prasknutia púčika až po jeho zastavenie rastu. Zvýšené koncentrácie atmosférického CO₂ môžu tiež ovplyvniť fenológiu buď priamo prostredníctvom zmeny v biochémií alebo fyziológii rastliny. Napríklad zmenami v koncentrácii škrobu alebo aj koncentrácii hormónov môže zmeniť vegetačný kl'ud a rastové zákonitosti posunom načasovania a trvania vegetačnej sezóny. (Jach a Ceulemans, 1999).

Roberntz a Stockfors (1998) zistili, že svetlom saturovaná fotosyntéza, meraná v rastúcej koncentrácii CO₂ (A_{max}) bola o 50 až 55 % vyššia po zvýšení CO₂, ako pri pestovaní pri súčasnej koncentrácii CO₂. Ukazovateľ dusíkovej koncentrácie vysvetľuje zvýšenie na 60 % variácie A_{max} . Efekt zvýšenia CO₂ na A_{max} bol najväčší v ihliciach s vysokou koncentráciou dusíka.

1.11.4 Dýchanie rastlín

Pri anabolických procesoch prebieha syntéza látok, z ktorých je rastlina vytvorená, pri katabolických procesoch sú tieto látky odbúravané. Substrátom pre tieto reakcie sú sacharidy, tuky alebo bielkoviny (Larcher, 1984; Procházka et al., 1998).

V procesoch fotosyntetickej asimilácie CO₂ sa tvoria sacharidy, ktoré predstavujú základný zdroj energie a organicky viazaného uhlíku a sú nevyhnutné pre život rastliny, ale taktiež pre všetky heterotrofné organizmy. Energia uložená v sacharidoch je riadene uvoľňovaná v procesoch, ktoré sa súhrne nazývajú dýchanie resp. respirácia (Pavlová, 2006).

Ešte aj v súčasnom období existuje málo poznatkov o základných vzťahoch medzi fotosyntézou a dýchaním. Je však potrebné do úvahy zobrať fakt, že energia potrebná pre respiráciu bunky sa berie zo svetelnej fázy fotosyntézy (Cannell a Thornley, 2000).

Zatiaľ čo pri fotosyntéze je energia získavaná využitím energie slnečného žiarenia, pri dýchaní dochádza k reakciám organického substrátu s molekulárnym kyslíkom. Avšak v oboch prípadoch sa vytvára krátkodobá energetická zásoba vo forme ATP (Procházka et al., 1998). Takto konzervovaná energia vo forme ATP, spolu s redukčnou silou NADH a príslušnými substrátmi sa využívajú pre syntézu ďalších dôležitých metabolitov (Procházka et al., 1998; Pavlová, 2006).

Dýchanie je súbor procesov, ktorými rastlina zaistuje využitie asimilátov pre rast, udržanie štruktúr a funkcií, transport látok a príjem iónov.

Chemicky možno proces dýchania sacharidov zapísať sumárnou rovnicou:



Respirácia konvenčne zahrňuje glykolýzu, Krebsov cyklus a transport elektrónov v dýchacom reťazci. Do procesov respirácie však môžu vstúpiť i látky vzniknuté odbúravaním proteínov alebo lipidov. Za normálnych podmienok sa respirácia ako celok prejavuje spotrebou O₂, uvoľňovaním CO₂ a vznikom H₂O (Pavlová, 2006)

Respiráciou sa „*stráca*“ až polovica produktov fotosyntézy, ale i napriek tomu označená „*strata*“ neodpovedá významu tohto procesu a jeho úlohe v metabolizme rastliny (Procházka et al., 1998).

Pri exergonickom rozklade látok je odštepovaný vodík a energia sa uvoľňuje v postupných krokoch. Vodík je prenášaný na konečný akceptor elektrónov. Pri dýchaní je týmto akceptorom vzdušný kyslík, ktorý prijíma vodík z reťazca prenášačov elektrónov po niekoľkých respiračných reakciách v mitochondriách. V tomto procese sa tvorí ATP oxidatívnou fosforiláciou (Larcher, 1998).

Organické látky sa v prvej fáze menia na hexózu, tuky podliehajú hydrolyze lipázou a menia sa na glycerol a mastné kyseliny. Ďalej z mastných kyselín pri β -oxidácii za účasti koenzýmu A vzniká acetylkoenzým A, ktorý prechádza do Krebsovho cyklu. Glycerol sa oxiduje na glyceraldehyd-3-fosfát, ktorý prechádza do glykolýzy. Bielkoviny sa v procese respirácie najprv hydrolyzujú na aminokyseliny, ktoré sa oxidačne deaminujú (Procházka et al., 1998).

1.11.5 Rozdelenie procesov dýchania

Proces dýchania je metabolicky veľmi komplexný. Vo všeobecnosti môžeme rozdeliť dýchanie na nasledovné fázy (Šetlík et al., 2010):

1. Glykolýza: Rozklad respiračného substrátu (sacharidy, tuky, bielkoviny) prebieha v postupných krokoch; glykolýza, dekarboxilácia, citrátový cyklus a oxidácia konečného akceptora elektrónov $\text{NADH}+\text{H}^+$.
2. Krebsov cyklus: Oxydácia acetyl-CoA v Krebsovom cykle až na 2 molekuly CO_2 .
3. Prenos elektrónov v dýchacom reťazci: Prenos elektrónov z $\text{NADH}+\text{H}^+$ až na kyslík, ktorý je takto redukovaný na H_2O .
4. Oxidačná fosforylácia: Pri ktorej je voľná energia prenosu elektrónov spojená so syntézou makroergickej zlúčeniny ATP.

1.11.6 Faktory ovplyvňujúce dýchanie

Respirácia prebieha vo všetkých živých bunkách stále a poskytuje energiu všetkým životným procesom, ktoré prebiehajú v rastlinách v tme a taktiež všetkým životným procesom, ktoré prebiehajú na svetle mimo chloroplastov. Rýchlosť respirácie závisí na rastovej a funkčnej aktivite rastliny alebo jej časti a taktiež na faktoroch vonkajšieho prostredia (Pavlová, 2006).

1.11.6.1 Závislosť na svetelných podmienkach

Procházka et al. (1998) uvádza, že priamy účinok žiarenia na zníženie rýchlosti dýchania vo fotosyntetických bunkách je predpokladaná viacerými autormi. V závislosti na spôsobe merania sa uvádza, že bunky obsahujúce chloroplasty redukujú na svetle rýchlosť dýchania na 70 až 35 % dýchania v tme.

Intenzita svetla behom dňa má však na rýchlosť dýchania vplyv i behom následnej periódy tmy. Boli stanovené i zmeny rýchlosti dýchania koreňov indukované svetelnými pomermi, ktorým boli vystavené listy. Pritom sa rozlišuje ako pôsobenie prostredníctvom fotosyntézy, kde sa uplatňuje množstvo substrátu a taktiež ako špecifický účinok svetla prejavujúci sa mechanizmom zatiaľ neznámym (Procházka et al., 1998).

Rýchlosť aktuálneho príjmu a výdaja CO₂ alebo O₂ listom na svetle je determinovaná aspoň štyrmi procesmi (Procházka et al., 1998):

1. fotosyntézou,
2. fotorespiráciou,
3. respiráciou
4. reutilizáciou CO₂ alebo O₂.

1.11.6.2 Závislosť na teplotných podmienkach

Podľa Procházka et al., (1998) teplotná závislosť rýchlosti dýchania vykazuje minimum okolo 0 °C, optimum v rozpätí 30 až 40 °C a maximálne hodnoty nad 50 °C. V rozsahu

teplôt od 10 do 25 °C je zvýšenie rýchlosti dýchania náraste tepoty o 10 °C asi dvojnásobné, teda Q_{10} je 2,0 (Atkin a Tjoelker, 2003).

Často teplotou sprostredkované zmeny v R sú modelované ako jednoduché exponenciálne funkcie teploty s konštantným Q_{10} blízko 2,0. V niektorých ohľadoch je to prekvapujúce, pretože bolo dlho známe, že Q_{10} nie je konštantná ani pri úrovni okolo 2,0 s výnimkou po obmedzení teplotného rozsahu. Skôr je Q_{10} závislá na tvare krivky odozvy dýchania na teplote (Procházka et al., 1998).

Nedávne práce ukázali, že teplotná závislosť Q_{10} je druhovo špecifická. V dôsledku toho možno konštatovať, že krátkodobé zvýšenie teploty môže mať väčší potenciálny vplyv na dýchanie u rastlín rastúcich v chladnejších podnebiach ako u rastlín rastúcich v teplejšom podnebí. Hodnoty Q_{10} vo vždy zelených rastlinách sú vyššie zime ako v lete (Atkin a Tjoelker, 2003).

Celkovo, tepelná aklimatizácia respirácie vyúsťuje v dlhodobú zníženú citlivosť respirácie na teplotu (Larigauderie a Körner, 1995).

Nedávne štúdie naznačujú, že najdôležitejším faktorom zodpovedným za teplotnú závislosť Q_{10} je vplyv teploty na reguláciu maximálnej enzymatickej aktivity procesu dýchania (Atkin et al., 2002).

Pri nameraných nízkych teplotách (5 °C) je respiračný tok obmedzený pravdepodobne cez V_{\max} z respiračného aparátu (t.j. glykolýza, Krebsov cyklus a mitochondriálny transport elektrónov). Je to kvôli inhibičnému efektu chladu na potenciálnu enzymovú aktivitu a/alebo kvôli obmedzeniam funkcií membránových enzýmov pri teplotách nižších ako prechodová teplota (T_m). Pri stredných teplotách je respiračný tok menej limitovaný (25 °C) enzymatickou kapacitou z dôvodu zvýšenia V_{\max} enzýmov viazaných v rozpustnej membráne. Dýchanie bude pravdepodobne limitované dostupnosťou substrátu a/alebo adenylátmi (najmä pomer ATP ku ADP a koncentrácia ADP). Zvýšená priepustnosť membrán pri teplotách nad prechodovou teplotou (T_m) (najmä pri vysokých teplotách) by mohli prispievať substrátovému obmedzeniu, pretože koncentračné gradienty (medziprodukty Krebsovho cyklu) je ťažko udržať, keď mitochondriálne membrány majú zvýšenú priepustnosť (Atkin a Tjoelker, 2003).

1.11.6.3 Závislosť respirácie od koncentrácie CO₂

Ak sa koncentrácia atmosférického CO₂ zvyšuje, má to rôzne dôsledky na metabolizmus rastlín, ako napríklad zmeny vo fotosyntéze, fotorespirácii alebo v dýchaní (Jahnke a Krewitt, 2002).

Pokiaľ ide o rýchlosť dýchania, dajú sa z prehľadu literatúry odvodiť údaje o silnom vplyve CO₂ na rýchlosť respirácie (*R*) rovnako ako popisy pokusov preukazujúcich nezávislosť *R* na koncentrácii CO₂ v atmosfére obklopujúcej list alebo celú rastlinu (Procházka et al., 1998).

Aj Roberntz a Stockfors (1998) popisujú, že respirácia sa môže meniť zvýšením alebo znížením koncentrácie CO₂.

Procházka et al. (1998) uvádza, že CO₂ pôsobí priamo na rastliny len dvoma spôsobmi:

1. ovplyvňuje rýchlosť karboxylácie enzýmom Rubisco, prípadne mení pomer medzi jeho karboxylázovou a oxygenázovou aktivitou a
2. mení otvorenosť prieduchov.

Nepriame účinky respirácie môžeme pozorovať, keď rastlina rastie pod zvýšenou koncentráciou CO₂ dlhší čas. Tieto zmeny môžu viesť k zvýšeným nárokom na respiráciu kvôli vyššej dostupnosti substrátu od syntézy neštruktúrálnych sacharidov počas dňa, kedy atmosférický CO₂ narastá (Thomas a Griffin, 1994). Tiež sa ale zistilo, že pri dlhodobom zvýšení CO₂ sa znížila rýchlosť respirácie, alebo sa nepozoroval žiadny významný efekt (Thomas a Griffin, 1994; Jahnke a Krewitt, 2002).

1.11.7 Vodný režim rastlín

Život vznikol vo vode a voda je stále jediné prostredie, kde môžu prebiehať biochemické procesy (Larcher, 1984).

Rastliny sa skladajú prevažne z vody, napr. listy čerstvej zeleniny obsahujú 90 až 99 %. Menej vody obsahujú xylémové časti stoniek, korene 70 až 90 % a najmenej

vody obsahujú semená 5 až 15 %, niektoré semená s veľkým obsahom tuku len 5 až 7 % vody (Larcher 1984; Procházka et al., 1998).

I pri relatívne veľmi malom obsahu vody v semene sa v ňom môže udržať životaschopný zárodok i niekoľko rokov. Naproti tomu krátkodobý pokles množstva vody v listoch pod cca 60 % vedie k nevratnému poškodeniu tkaniva a k smrti orgánu (Procházka et al., 1998).

Životu na súši sa rastliny prispôbili tým, že vyvinuli štruktúrne i metabolické mechanizmy, ktoré im umožňujú vytvoriť a udržať dostatočne hydratované vnútorné prostredie a prežiť kritické obdobia nedostatku vody. Podľa charakteru adaptácie a prevažujúcej stratégie sa rastliny označujú ako poikilohydrické alebo homoiohydrické (Pavlová, 2005).

1.11.8 Poikolihydrické rastliny

Prispôbujú svoj obsah vody vlhkosti okoliu, teda sú tolerantné k vyschnutiu. Patria sem baktérie, riasy, sinice. Tieto rastliny môžu „vyschnúť“ a pritom nestratia schopnosť revitalizovať sa. Tieto rastliny nemajú vo svojej bunke vakuolu (Larcher, 1984; Procházka et al., 1998).

1.11.9 Homoiohydrické rastliny

Tieto rastliny vznikli zo zelených rias s vakuolizovanými bunkami. Majú veľkú centrálnu vakuolu, efektívny koreňový systém pre príjem vody a sústavu vodivých pletív. Prítomnosť veľkej vakuoly spôsobuje stratu schopnosti rastliny znášať vysušenie avšak udržuje značnú zásobu vody umožňujúcu dostatočnú hydratáciu bunčných štruktúr. Výdaj vody vo forme vodnej pary (transpirácia) je výrazne obmedzený vytvorením ochranej vrstvy (kutikuly) a riadený prieduchmi (Larcher, 1984; Pavlová 2005).

Termín vodný režim rastlín zahrňuje príjem vody rastlinou z okolitého prostredia, vedenie vody teda jej pohyb v rastline a výdaj vody z rastliny do okolitého prostredia. Je neoddeliteľne spojený s ďalšími dôležitými procesmi, ktoré sa týkajú rastliny ako indivídua a jej interakcie s prostredím. Je to predovšetkým príjem

minerálnych látok, transport látok v rastline, termoregulácia a výmena energie s prostredím (Pavlová, 2005).

1.11.10 Príjem a transport vody rastlinou

Rastliny môžu absorbovať vodu celým svojím povrchom, ale najväčší diel je získavaný z pôdy (Larcher, 1984).

Transfer vody z pôdy, cez vegetáciu do atmosféry sa koná prostredníctvom sústavy pôda-rastlina-atmosféra, pozdĺž vodného potenciálu alebo gradientom hydrostatického tlaku (Sellin a Kupper, 2005).

Vyššie suchozemské rastliny prijímajú vodu koreňmi z pôdneho roztoku súčasne s minerálnymi látkami (Pavlová, 2005).

Voda preniká do pôdy po zrážkach a postupne presakuje stále hlbšie ku koreňom (Larcher, 1984).

Z pôdy nasávajú vodu prevažne bunky koreňových vláskov. Tie pokrývajú úsek koreňa, ktorý začína blízko pod jeho špičkou (Šetlík et al., 2010).

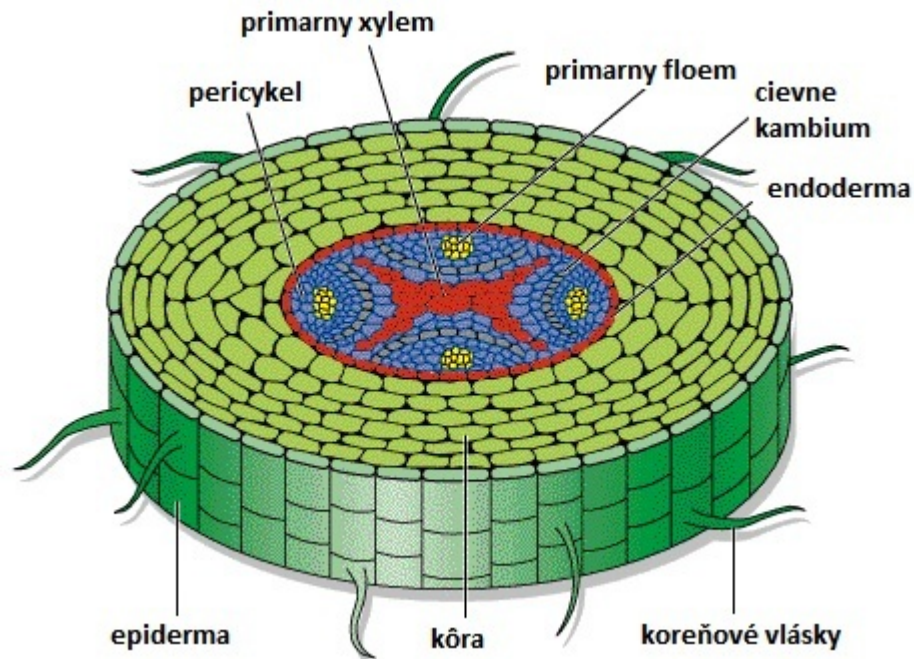
Od povrchu koreňa je voda vedená radiálne živými pletivami cez rhizodermis, primárnu kôru a endodermis do parenchýmu centrálného valca (Pavlová, 2005).

Kde je cesta prerušená Caspariho pásikom a môže teda dôjsť ku kontrole látok prijímaných s pôdnym roztokom (Šetlík et al., 2010).

Parenchýmom centrálného valca je voda transportovaná k vodivým pletivám radiálneho cievného zväzku, kde vstupuje do xylému (Pavlová, 2005).

To, že sa povrazec vody nepretrhne, i keď je vystavený vysokému ťahu, je dané príľnavosťou teda adhéziou vody k celulóznym stenám ciev a kohéznymi silami vodných molekúl. Takto môžu listy stromov vytiahnuť satím svojich buniek vodu až do koruny i niekoľko desiatok metrov vysoko (Šetlík et al., 2010).

Xylómom je voda vedená axiálne do prýtu. V prýte je z xylému vedená radiálne živými pletivami do buniek stielky, listov a ďalších orgánov nadzemnej časti. Vo fotosyntetizujúcich pletivách je značné množstvo vody z xylému vedené do floému kde slúži na transport asimilátov do miest ich aktuálnej potreby (Pavlová, 2005).



Obr. 10 Priečny rez koreňom s koreňovými vláskami
(http://www.progressivegardens.com/growers_guide/root1.jpg).

1.11.11 Výdaj vody (transpirácia)

Rastlina vydáva vodu do ovzdušia predovšetkým listami vo forme vodnej pary, ktorú získava z pôdy koreňmi (Šetlík et al., 2010).

Výdaj vody rastlinou do atmosféry v tejto forme sa nazýva transpirácia. Voda prechádza do plynného skupenstva na vonkajšom i vnútornom povrchu nadzemnej časti rastliny. Najväčšia časť vonkajšieho a vnútorného povrchu u väčšiny rastlín je tvorená povrchom buniek listových čepelí (Pavlová, 2005).

Transpirácia rastlín môže byť popísaná podľa Ohmovho zákona: transpirácia je poháňaná rozdielom tlaku pár medzi listom a vzduchom, a je riadená listovou vodivosťou, súčasne zložená z paralelných prieduchov a kutikulárnych vodičov (cuticular conductances in series) s hraničnou listovou vodivosťou (Burkhardt et al., 2001).

Podľa Pavlovej (2005) výdaj vody vo forme vodnej pary teda transpirácia je výrazne obmedzený vytvorením ochrannej vrstvy teda kutikuly a riadený funkčnými prieduchmi.

1.11.11.1 Kutikulárna transpirácia

Vonkajší povrch rastliny je tvorený vnútornou stranou pokožkových a zatváracích buniek. Tento povrch je krytý kutikulou a je v priamom kontakte s atmosférou. Z vonkajšej strany buniek pokožky a zatváracích buniek do oblasti pohybujúceho sa vzduchu voda difunduje pevnou fázou kutikuly a hraničnou vrstvou vzduchu. Výdaj vody touto cestou sa nazýva kutikulárna transpirácia (Pavlová, 2005).

Kutikulárna transpirácia môže byť považovaná za difúziu cez hydrofóbne médium, pretože molekuly vody musia prechádzať kutinizovanými vrstvami vnútornej steny epidermis i kutikulou samotnou (Larcher, 1984).

Podľa Larchera (1984) a Procházku et al. (1998) kutikulárna transpirácia závisí od usporiadania, hustoty a počtu kutinových a voskových lamiel uložených na vonkajšej strane epidermis a podľa hrúbky kutikuly.

Na kutikulárnu transpiráciu pripadá u ihličnanov 3 až 10 % (Procházka et al., 1998).

1.11.11.2 Stomatárna vodivosť

Vnútorný povrch rastliny tvorí plocha bunkových stien, ktorá je v kontakte s plynnou fázou vyplňajúcou medzibunkové priestory. Veľkosť vnútorného povrchu je pre prechod vody do plynnej fázy a pre výdaj vody rastlinou do atmosféry veľmi významný. Uvádza sa, že list má vnútorný povrch 7 až 30 krát väčší než svoju vonkajšiu plochu. Z vnútorného povrchu rastliny vodná para difunduje medzibunkovými do podprieduchových dutín a odtiaľ prieduchovými štrbinami cez hraničnú vrstvu nehybného vzduchu do atmosféry. Výdaj vody touto cestou sa nazýva stomatárna transpirácia (Pavlová, 2005).

Je vo všeobecnosti známe, že stomatálna vodivosť môže byť opísaná ako geometrická funkcia prieduchov, a to ako dĺžka pórov, veľkosť pórov, šírka a hĺbka pórov (Lushnikov et al., 1994).

V listovom meradle, modely stomatálnej vodivosti sa často predpokladajú, priamu súvislosť medzi fotosyntézou a prieduchovou vodivosťou (Burkhardt et al., 2001).

Najväčšiu špecifickú transpiráciu majú listy bažinatých rastlín. Tienné rastliny transpirujú s polovičnou intenzitou, a stromy sklerofilné rastliny ešte pomalšie. Taktiež v rýchlosti transpirácie sa líšia aj jednotlivé orgány rastlín. Maximálna rýchlosť transpirácie rastlín v prírode presne odpovedá špecifickej transpiračnej schopnosti (Larcher, 1984).

U asimilačných orgánov ihličnanov môže nízku transpiračnú schopnosť spôsobovať pórovitá vosková zátka v dutine prieduchov, ktorá znižuje možnú difúziu vodnej pary na $\frac{1}{3}$. Taktiež rýchlosť transpirácie závisí od difúzneho odporu prieduchu. Tento difúzny odpor závisí od stupňa otvorenia prieduchu. Ide o anatomické vlastnosti druhu. Najväčšie difúzne odpory pri maximálnom otvorení prieduchov nachádzame u xerofytov, sukulentov a ihličnanoch (300 až 800 s.m^{-1}) (Procházka et al., 1998).

1.11.12 Faktory ovplyvňujúce transpiráciu

1.11.12.1 Vplyv UV-B žiarenia na transpiráciu

Dopadajúce UV-B žiarenie na zemský povrch má potenciálne škodlivé účinky na prírodný rastlinný ekosystém (Caldwell et al., 1995).

Zvýšená intenzita UV-B žiarenia by mohla ovplyvniť rast rastlín a fyziológiu ako napríklad počet listov, listovú plochu, koncentráciu chlorofylu a pod. (Yuan-gang Zu et al., 2010).

Yuan-gang Zu et al. (2010) skúmal vplyv UV-B žiarenia na obsah Taxolu v *Taxus chinensis* var. *Mairei*. Rastliny pestoval v komore s umelou klímou a zvýšeným UV-B žiarením. Meral hodnoty pre čistú asimiláciu CO_2 , transpiráciu, prieduchovú vodivosť a efektivitu využiteľnej vody. Taktiež pozoroval štrukturálne zmeny prieduchového aparátu.

Výsledky ukázali, že listová plocha bola výrazne znížená pri zvýšenom žiarení UV-B a to až o ($p < 0,05$). Taktiež bol pozorovaný zvýšený počet listov (Yuan-gang Zu et al., 2010).

Pokles listovej plochy mohol byť zapríčinený poškodením fotosyntetického aparátu, pretože UV-B žiarenie spôsobilo kumulatívny efekt poškodenia a inhibovania fyziologických funkcií (González, et al., 2009).

Ďalej výsledky elektrónovej mikroskopie poukázali zvýšenú hustotu prieduchov na adaxiálnej epidermálnej časti listov *Taxus chinensis* var. *Mairei* pri zvýšenom žiarení UV-B oproti kontrole. (Yuan-gang Zu et al., 2010).

Ďalej výsledky preukázali, že UV-B žiarenie malo vplyv na poškodenie fotosyntetického aparátu. V porovnaní s okolitými podmienkami došlo ku zníženiu CO₂ asimilácie o 56.2 %, transpirácie o 12.7 %, stomatárna vodivosť o 41.9 % a efektívnu využiteľnosť vody o 49.7 % (Yuan-gang Zu et al., 2010).

1.11.12.2 Vplyv svetla

Pretože svetelné podmienky v rámci lesa sú veľmi premenlivé ako v priestore tak i v čase začal sa Sellin (2001) zaoberať štúdiom vplyvu svetla na stomatálnu vodivosť v slnných a tiennych ihliciach. Vo všeobecnosti, prieduchy sú otvorené na svetle alebo pri nízkej koncentrácii CO₂ v medzibunkových priestoroch a zatvárajú sa v tme.

Prieduchy v tieňomilných druhoch majú tendenciu sa otvárať rýchlejšie pri nižšej úrovni svetelného žiarenia než netolerantné druhy, aj keď ihlice vystavené slnku majú vyššiu listovú vodivosť v porovnaní s neexponovanými listami (Mitchell, 1998).

Stomatálne reakcie na fotosyntetickú fotónovú indukciu (Q_D) závisí od typu ihlíc (tienny alebo slnný typ) a taktiež veku ihlíc. Slnné typy ihlíc preukázali vyššie denné maximá listovej vodivosti ako v porovnaní s tiennymi ihlicami. Svetlom saturovaná listová vodivosť vyjadrená na jednotku (PLA projected leaf area) bola 1,3 – 1,4 krát vyššia a prostredníctvom denného maxima 1,6 krát vyššia ako v tiennych výhonkoch. Rozdiely v maximálnych hodnotách listovej vodivosti medzi slnnými a tiennymi ihlicami vyjadrené v pomere k celkovej listovej ploche (TLA), boli do istej miery menšie.

V skutočnosti prieduchová citlivosť na zmeny svetla bola rozdielna ráno a večer pre obe typy listov. Pomer medzi svetlom saturovanou vodivosťou k intenzite toku fotosyntetických fotónov (FAR) bol väčší v podvečer. Taktiež bol štatistický významný rozdiel v pomere svetlom saturovanou vodivosťou k fotochemickému zhášaniu

fluorescencie chlorofylu *a* (qP) v tiennych ihliciach ráno a večer. Prieduchy zvyčajne nie sú úplne uzavreté v tme pred východom slnka a po západe slnka. Prieduch slnných ihlíc a staršie výhonky boli viacej otvorené za úsvitu a západu slnka v porovnaní s tiennymi ihlicami a mladšími výhonkami. Tak nočné straty vody sú spôsobené predovšetkým staršími výhonkami a zmeny v prieduchoch sú závislé na veku (Sellin, 2001).

2 Cieľ práce

Všeobecným cieľom práce bolo popísať adaptačné mechanizmy fyziologických procesov rastlín tisu obyčajného (*Taxus baccata* L.) na intenzitu slnečného svetla.

Čiastkovými cieľmi práce bolo:

1. študovať aklimačné reakcie výslnných a tienných ihlíc tisu obyčajného;
2. popísať zmeny vo vodnom režime rastlín tisu obyčajného počas vegetačnej periódy;
3. kvantifikovať zmeny v efektívnosti konverzie slnečnej energie výslnných a tienných ihlíc rastlín tisu obyčajného počas vegetačnej periódy.

3 Metodika práce

3.1 Charakteristika biologického materiálu

Tis obyčajný *Taxus baccata* do rovnomennej triedy Tisy – Taxospida a do čeľade *Taxaceae*. Je to nižší strom okolo 17,5 m často viac kmenný ker. Koruna je kúžeľovitá nepravidelná. Tis je dvojdomá rastlina, kvitne v marci až apríli. Samčie jedince prvý krát kvitnú v 10. roku života, samičie jedince o desať rokov neskôr.

Biologický materiál bol odoberaný z prirodzených podmienok Botanickéj záhrady SPU v Nitre. Náhodným výberom sme odobrali jednorôčné výhony zo slnnej a tiennej strany koruny v dvoch termínoch: v jarnom a zimnom období.

3.2 Analýza fluorescencie chlorofylu *a*

3.2.1 Rýchla kinetika fluorescencie chlorofylu *a*

Princíp metódy vychádza zo skutočnosti, že fluorescencia pochádza prioritne z molekúl chlorofylu asociovaných na PSII, so slabou participáciou PSI. Rýchla kinetika fluorescencie chlorofylu *a* bola meraná prenosným fluorometrom Handy PEA (Plant Efficient Analyser) (Hansatech Instrument, Norfolk, England) a analyzovaná JIP-testom (Strasser et al. 1995), softwerom Handy PEA 1.3 a programom Biolyzer® 3.06. Použili sme 1s pulz červeného svetla o intenzite $3500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po 20 minútovej adaptácii vzorky na tmu. Fluorescenčné signály boli zaznamenávané v časovom úseku od 10 μs do 1s a premietnuté do logaritmickej časovej mierky charakteristickej krivky OJIP.

3.2.2 Základné pojmy:

F – fluorescencia

ABS – absorpčný tok

RC – plne aktívne reakčné centrá

CS – prierez vzorky (cross section)

TR – transport elektrónov z antén do reakčného centra (trapping flux)

ET - elektrónový transport z reakčného centra na primárny akceptor

DI – tepelná disipácia – uvoľnenie energie vo forme tepla

3.2.3 Parametre JIP testu

Základné parametre stanovenia fluorescencie formou JIP testu (Strasser et al. 1995).

F₀ - F_{50μs}, fluorescencia pri 50μs (počiatočná fluorescencia)

F₁₅₀ – fluorescencia pri 150μs

F₃₀₀ – fluorescencia pri 300μs

F_J – fluorescencia v kroku K (2ms)

F₁ - fluorescencia v kroku I (30ms)

F_M – maximálna fluorescencia

T_{fmax} – čas potrebný na dosiahnutie maximálnej fluorescencie v ms

F_V – variabilná fluorescencia daná ako rozdiel maximálnej a počiatočnej fluorescencie

F_V/F_M – maximálna fotochemická efektívnosť PSII

Area – plocha medzi fluorescenčnou krivkou a hodnotou F_M (veľkosť zásoby akceptorou elektrónového transportu PSII)

F₀/F_M - bazálny kvantový výťažok nefotochemických

F_V/F₀ – maximálny pomer kvantových výťažkov fotochemických procesov a konkurenčných nefotochemických procesov

dv/dt₀ (M0) – počiatočný sklon fluorescenčnej krivky, ktorí vyjadruje rýchlosť akumulácie uzavretých reakčných centier

V_J – relatívna variabilná fluorescencia v čase J

V_I – relatívna variabilná fluorescencia v čase I

PSI_0 – kapacita transferu excitónu k elektrónovému transportnému reťazcu

PHI_{E0} – maximálny výťažok elektrónového transportu

PHI_{D0} – výťažok technickej disipácie

S_m – vyjadruje energiu potrebnú na zatvorenie všetkých reakčných centier

ABS/RC – priemerná veľkosť antén, efektívna veľkosť antén aktívneho reakčného centra. Vyjadruje celkový počet fotónov absorbovaných molekulami chlorofylu všetkých reakčných centier.

TR_0/RC – maximálna rýchlosť zachytávania PSII – tok excitónov na reakčné centrá

ET_0/RC - elektrónový transport v aktívnych RC, reoxidácia redukovaného Q_A cez elektrónový transport v aktívnom RC

TR_0/CS_0 – prenos excitónu na reakčné centrum prepočítaný na excitované cross section

ET_0/CS_0 – elektrónový transport prepočítaný na excitované cross section, reoxidácia redukovaného Q_A cez elektrónový transport

3.3 Kvantitatívne stanovenie asimilačných pigmentov

Koncentrácia asimilačných pigmentov (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a celkové karotenoidy) sa merala spektrofotometricky podľa Porra et al. (1989). Ihlice sa homogenizovali v trecej miske s kremičitým pieskom s 80% acetónom (Slavus, Bratislava, SK) pufrovaným na pH 7,4. Nečistoty boli oddelené centrifugáciou pri 2500 ot min⁻¹ počas 3 min na centrifúge T51 (VEB MLW Medizintechnik, Leipzig, Germany). Absorbancia supernatantu extraktu listov sa merala spektrofotometrom Jenway 6405 (Jenway UV/VIS – Jenway, Essex, united Kingdom) pri vlnových dĺžkach (λ) 663,6 nm (chl *a*), 646,6 nm (chl *b*) a 470 nm (celkové karotenoidy). Pri vlnovej dĺžke 750 nm sa merala absorbancia nečistôt (proteíny, triesloviny) v supernatante. Hodnota absorbcie roztoku pri λ 750 nm sa odčítala od absorpcií pri λ 663,6, 646,3 a 470 nm.

Koncentrácia jednotlivých asimilačných pigmentov (mg l^{-1} extraktu) sa vypočítala podľa rovníc (Lichtenthaler, 1987; Porra et al. 1989):

$$\text{Chlorofyl } a = (12,25 \cdot A_{663,6} - 2,55 \cdot A_{646,6}) \cdot D$$

$$\text{Chlorofyl } b = 20,31 \cdot A_{646,6} - 4,91 \cdot A_{663,6}) \cdot D$$

$$\text{Celkové karotenoidy} = [(1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot (\text{Chl } a) - 85,02 \cdot (\text{Chl } b)) / 198] \cdot D$$

kde $A_{663,6}$, $A_{646,6}$ a A_{470} je absorbancia extraktu pri jednotlivých λ (663,6; 646,6 resp. 470 nm) a D je hrúbka spektrofotometrickej kyvety (cm).

Celkové koncentrácie chl a , chl b a celkových karotenoidov v liste sa prepočítali na jednotky mg m^{-2} plochy ihlíc.

3.4 Stanovenie vody v rastline

3.4.1 Stanovenie obsahu celkovej vody

Obsah celkovej vody v pletive stanovíme poznajúc jeho čerstvú hmotnosť a hmotnosť po vysušení do konštantnej hmotnosti. Ako rastlinný materiál nám slúžili vetvičky tisu obyčajného (*Taxus baccata* L.), ktoré boli odoberané z tiennej a slnnej strany.

Z rastlinného materiálu sme odobrali po desať ihlíc, ktoré sme odvážili na analytických váhach (Kern®, Kern&Sohn GmbH, ALS 220-4N, D-72336, Balingen, Germany) . Zistili sme si čerstvú hmotnosť (ČH). Odvážené ihlice sme vložili do papierového vrečka a vložili do elektrickej sušiarne (OP 60 LTE Scientific LTD, Greenwich, United Kingdom). Rastlinný materiál sme sušili pri teplote 80°C 48 h. do konštantnej hmotnosti. Po vysušení sme odvážili hmotnosť sušiny (SUŠ).

Hmotnosť vody v rastlinnom materiály sme vypočítali podľa vzťahu:

$$\text{Hmotnosť H}_2\text{O} = \text{ČH} - \text{SUŠ (g)}$$

Percento celkovej vody sa vypočítala podľa vzťahu:

$$\% \text{ celkovej vody} = \text{hmotnosť H}_2\text{O} \cdot 100 / \text{ČH}$$

3.4.2 Stanovenie obsahu voľnej vody v pletive refraktometricky

Do skúmavky sme napipetovali presne 2 ml 52 % roztoku sacharózy. Odobrali sme desať ihlíc a vložili do skúmavky s 52 % roztokom sacharózy tak, aby rastlinný materiál bol ponorený, uzavreli a nechali exponovať v hypertonickom roztoku 120 minút. Po exponovaní sme stanovili percento refraktometrickej sušiny (% RS) pôvodne 52 % roztoku sacharózy digitálnym refraktometrom PAL-1 (ALTAGO Ltd, Tokyo Japonsko).

3.4.3 Stanovenie obsahu viazanej vody

V paralelne uskutočnených meraniach sme zisťovali obsah voľnej vody refraktometricky a obsah celkovej vody gravimetricky.

Výpočet pre percento viazanej vody:

$$\% \text{ viazanej vody} = \% \text{ celkovej vody} - \% \text{ voľnej vody} (\%)$$

3.4.4 Stanovenie relatívneho obsahu vody RWC

Relatívny obsah vody (RWC) bol stanovený z čerstvej hmotnosti (ČH) a saturovanej hmotnosti (SAT) a hmotnosti sušiny (SUŠ) dospelých ihlíc rastliny *Taxus baccata* L. Z rastlinného materiálu sme si navážili 0,5 g ihlíc, ktoré sme vložili do vialky zaliali destilovanou vodou a vložili do chladničky. Saturovaná hmotnosť bola stanovená po 4 hod. dysycovaním ihlíc pri teplote 4 °C.

Sušenie ihlíc sa uskutočnilo pri 80 °C po dobu 48 hod. RWC sa vypočítalo podľa vzťahu:

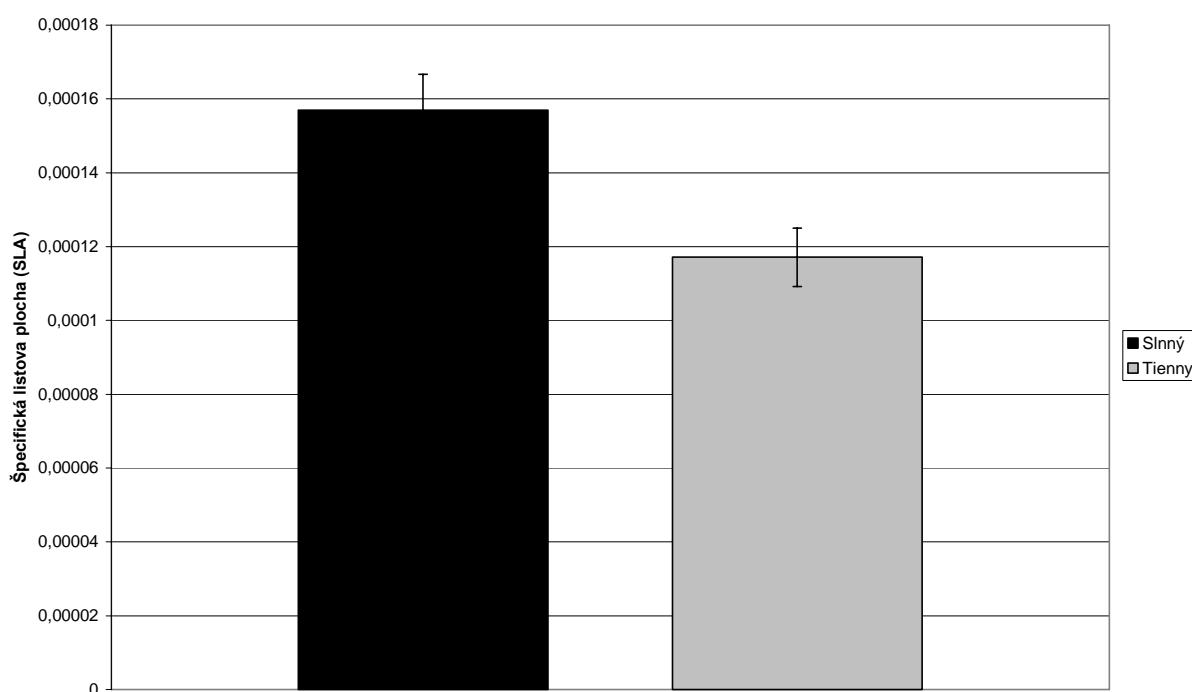
$$\text{RWC} = (\text{ČH} - \text{SUŠ}) / (\text{SAT} - \text{SUŠ})$$

3.5 Spracovanie výsledkov

Výsledky boli získavané a spracované počítačovým programom MS Excel a Černota. Pokusy sa robili v štyroch opakovaniach. Pri stanovení fluorescencie chlorofylov sa vykonalo desať opakovaní.

4 Výsledky práce a diskusia

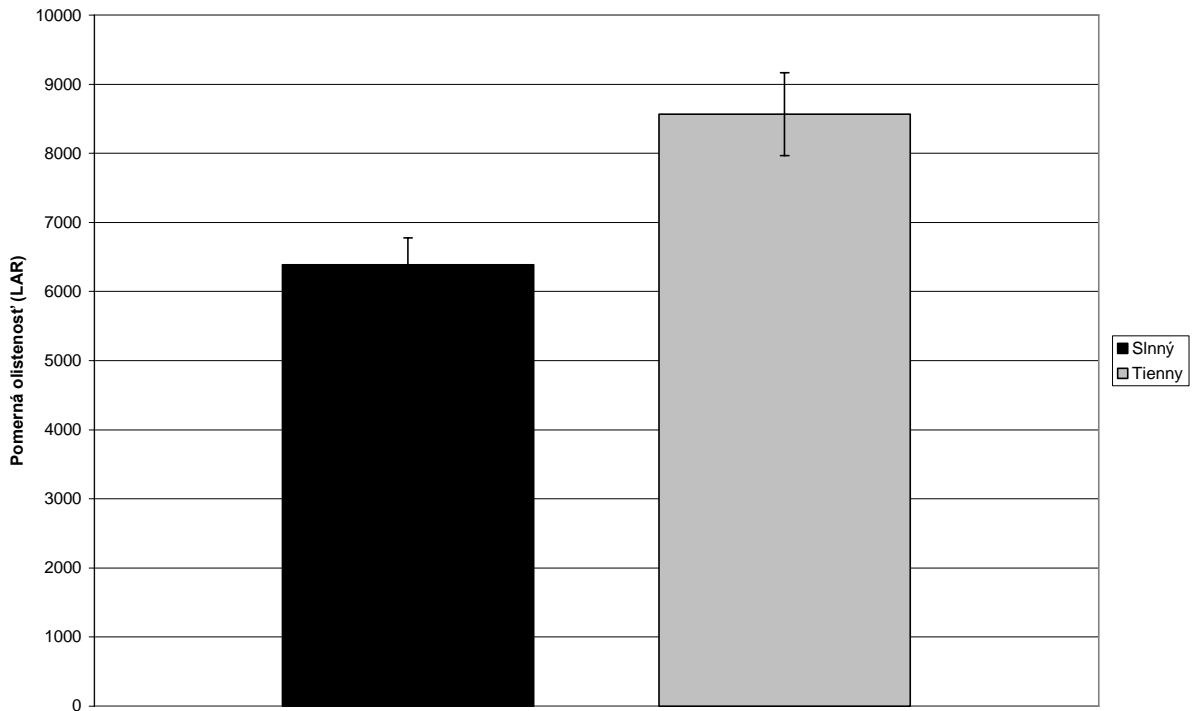
Ihlice u oboch typov vzoriek (slnný a tienny typ) boli rovnako veľké a mali približne rovnakú váhu. Listová plocha tienných typov ihlíc nebola výrazne nižšia i keď tam boli menšie odchýlky. Rozdiel bol viditeľný až keď sme vyrátali hodnotu Špecifická listová plocha (SLA) ako je vidieť z grafu č. 1 a to v prospech slnných typov ihlíc oproti tiennemu typu.



Graf 1 Špecifická listová plocha (SLA) v slnných a tienných ihliciach *Taxus baccata* L.

K tomuto zvýšeniu mohlo dôjsť kvôli zvýšenému svetelnému žiareniu a tým zvýšenej tvorbe a kumulácii etylénu a práve hromadenie etylénu, ktorý je pre rastliny rastovým hormónom viedlo k zvýšeniu počtu listov (Yuan-gang Zu et al., 2010).

Pomerná olistenosť (LAR) bola zase nižšia v slnných typoch ihlíc oproti tiennym, čo môžeme vidieť v grafe č. 2.

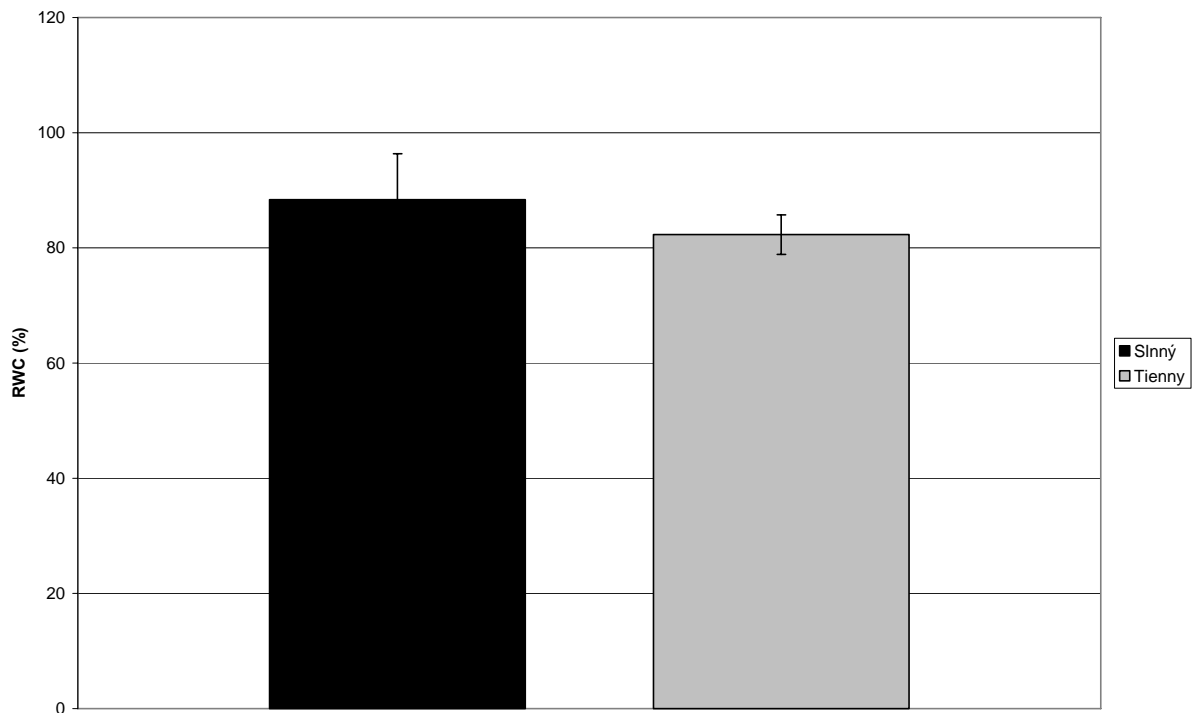


Graf 2 Pomerná olistenosť (LAR) v slných a tienných ihliciach *Taxus baccata* L.

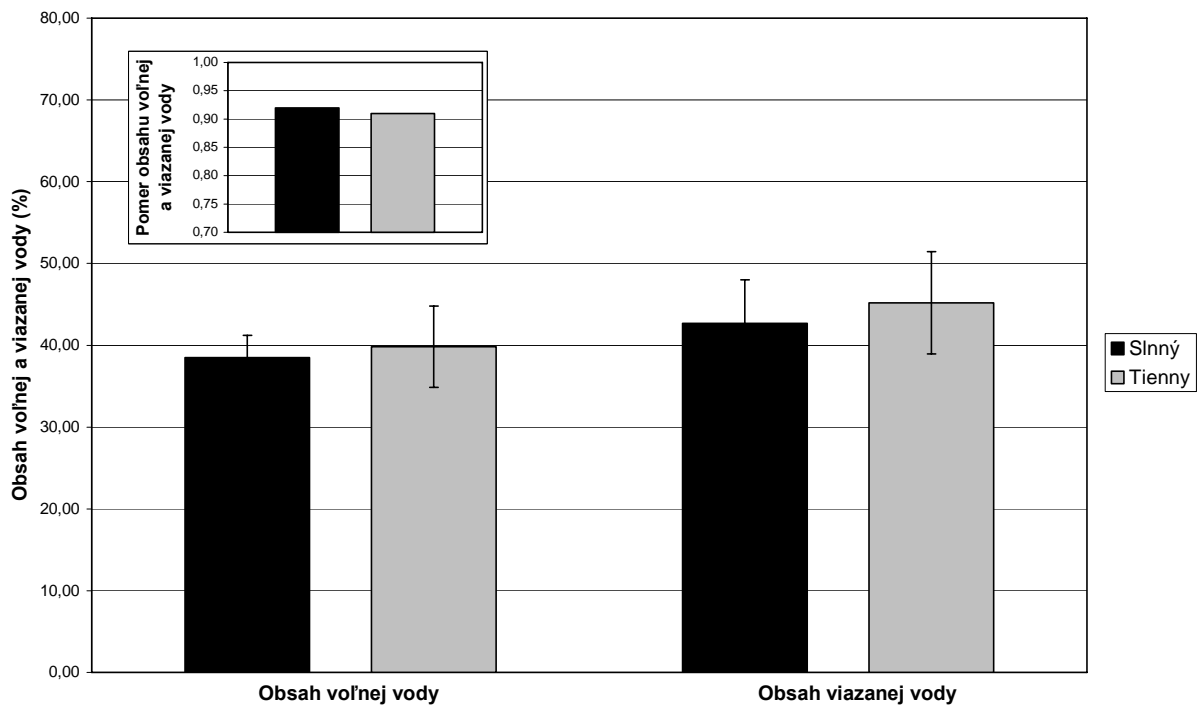
Jedným zo sledovaných fyziologických ukazovateľov bol relatívny obsah vody (RWC). RWC úzko koreluje s celkovým obsahom vody v rastline. Pokusom sme sledovali RWC v slných a tienných ihliciach tisu. Zistili sme, že v slných ihliciach je vyšší priemerný obsah vody (88,40 %) ako v tienných ihliciach (82,22 %) (pozri graf č. 2). V tienných ihliciach bol relatívny obsah vody nižší ako v slných avšak v jednotlivých opakovaníach nebol až tak výrazný. Tento nižší obsah vody mohol byť spôsobený tým, že prieduchy tieňomilných rastlín majú tendenciu sa otvárať rýchlejšie pri nižšej úrovni svetelného žiarenia než tolerantné druhy. Aj keď ihlice vystavené slnku majú vyššiu listovú vodivosť (Mitchell, 1998).

Taktiež sme stanovovali voľnú a viazanú vodu, ktorá určuje rýchlosť fyziologických procesov v rastline akými sú napr. metabolizmus alebo rast rastlín. Táto voda je prítomná v bunkových kompartmentoch rastlín ako napr. vakuola, z ktorej sa môže strácať transpiráciou. Ako je vidieť z grafu č. 4, v priemere sa obe vzorky nelíšili. Priemerná hodnota slných ihlíc bola 38,52 % a tienných ihlíc 39,83 %. Avšak bol rozdiel medzi jednotlivými meraniami. Viazaná voda nám vyšla v tienných ihliciach 45,19 % čo bolo o 2,5 % viacej ako v slných ihliciach. Pomer medzi voľnou

a viazanou bol 0,92 u slnných ihliciach ku 0,91 ku tiennym ihliciach. Tieto rozdiel neboli signifikantné.



Graf 3 Relatívny obsah vody (RWC) v slnných a tiennych ihliciach *Taxus baccata* L.



Graf 4 Obsah voľnej a viazanej vody, a pomer medzi voľnou a viazanou vodou v s slnných a tiennych ihliciach *Taxus baccata* L.

Na obsah vody má vplyv aj fotosyntéza, ktorá je jedným z najdôležitejších fyziologických procesov (Procházka et al., 1998). Na priebeh fotosyntézy vplýva množstvo faktorov. Jedným z nich je aj obsah fotochemických pigmentov. Z týchto pigmentov sú najdôležitejšie chlorofyl *a*, takzvaný aktívny chlorofyl, ktorý absorbuje slnečnú energiu, chlorofyl *b* a celkové karotenoidy (Michalík, 2005).

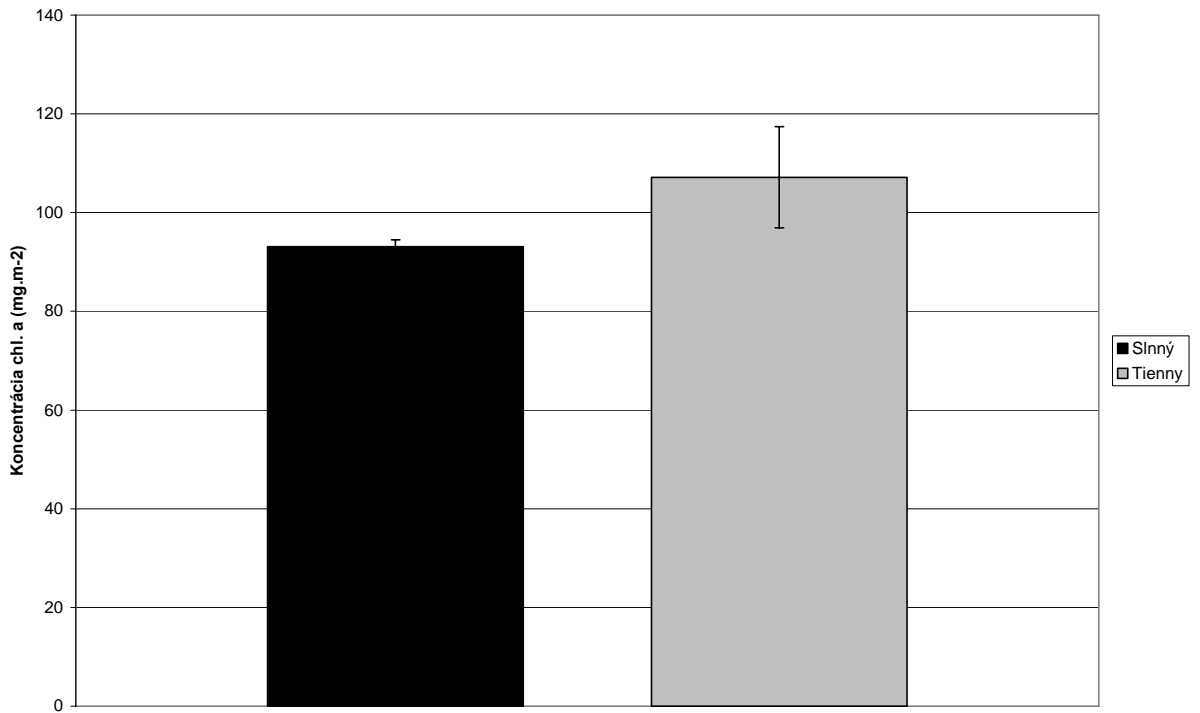
V našich rastlinných vzorkách sme stanovovali obsah chl. *a*, chl. *b* a celkových karotenoidov. Pri porovnávaní chlorofylu *a* v tiennych a slnných ihliciach *Taxus baccata* bol obsah chlorofylu *a* v slnných ihliciach $93,10 \pm 1,36 \text{ mg.m}^{-2}$ a v tiennych ihliciach $107,15 \pm 10,26 \text{ mg.m}^{-2}$. Tento vyšší obsah chlorofylu *a* v tiennych ihliciach bol o 15,15 % ako to je vidieť z grafu č. 5 a tento rozdiel bol štatisticky významný. Tento rozdiel mohol byť zapríčinený tým že *Taxus baccata* je tieňomilný strom a na slnku dochádza k poškodeniu svetlo zberných antén a PSII (Mitchell, 1998).

Koncentrácia chlorofylu *b* zase lepšie vyšla pre slnné ihlice oproti tiennym ihliciám. Obsah chlorofylu *b* v slnných ihliciach bol $88,60 \pm 16,10 \text{ mg.m}^{-2}$ čo je o 12,30 % viacej oproti tiennym ihliciám, v ktorých sa koncentrácia chlorofylu *b* pohybovala okolo $77,70 \pm 8,61 \text{ mg.m}^{-2}$ čo bolo 87,70 % avšak tento rozdiel nebol signifikantný.

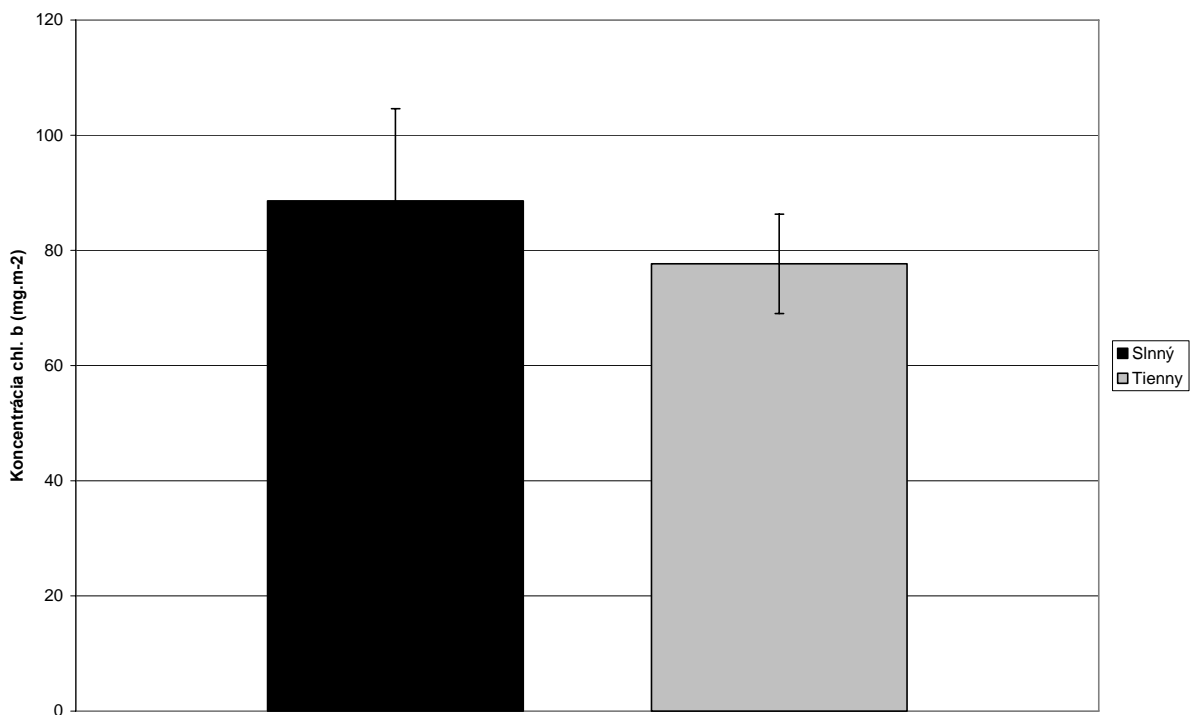
V našej práci sme stanovovali aj koncentráciu celkových karotenoidov, ktoré v rastline slúžia ako „vychytávače“ voľných radikálov. Tieto doplnkové pigmenty chránia fotosyntetický aparát (PSII) pred nevratnou fotooxidáciou a sú regulátormi účinnosti prenosu excitácie z antény do reakčného centra (Mitchell 1998; Procházka et al., 1998; Šetlík et al., 2010). Pri stanovovaní koncentrácie celkových karotenoidov sme zistili, že koncentrácia v slnných ihliciach bola $25,60 \text{ mg.m}^{-2}$ a v tiennych ihliciach $36,50 \text{ mg.m}^{-2}$. Ako vidieť na grafe č. 7, v tiennych ihliciach bola koncentrácia väčšia o 42,60 % . Väčšiu koncentráciu sme čakali v slnných ihliciach ako v tiennych.

Môžeme predpokladať, že tento signifikantný rozdiel mohol byť zapríčinený odberom vzoriek v zimnom období resp. prechodu zo zimy na jar.

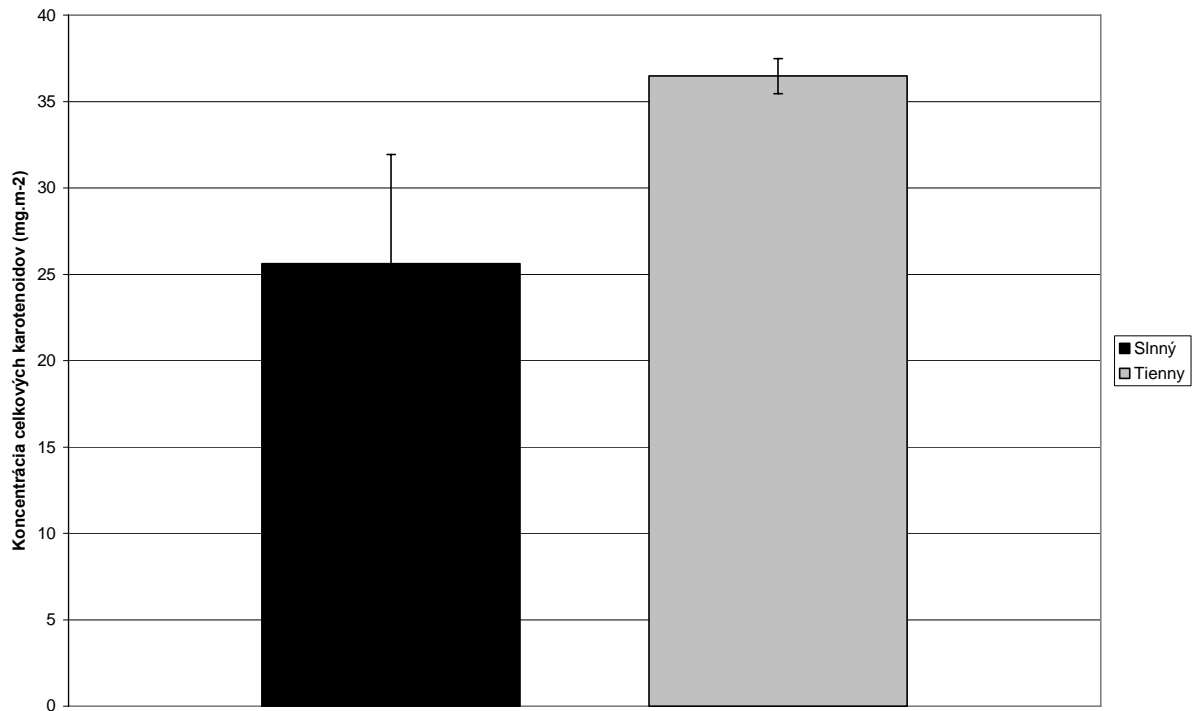
Taktiež sme si vyrátali pomer medzi chlorofylom *a* a chlorofylom *b*, ktorý je znázornený na grafe č. 8. Tento pomer bol väčší v tiennych ihliciach, a to o 29,90 % oproti slnným ihliciám. Tento zvýšený pomer nebol nejako štatisticky významný.



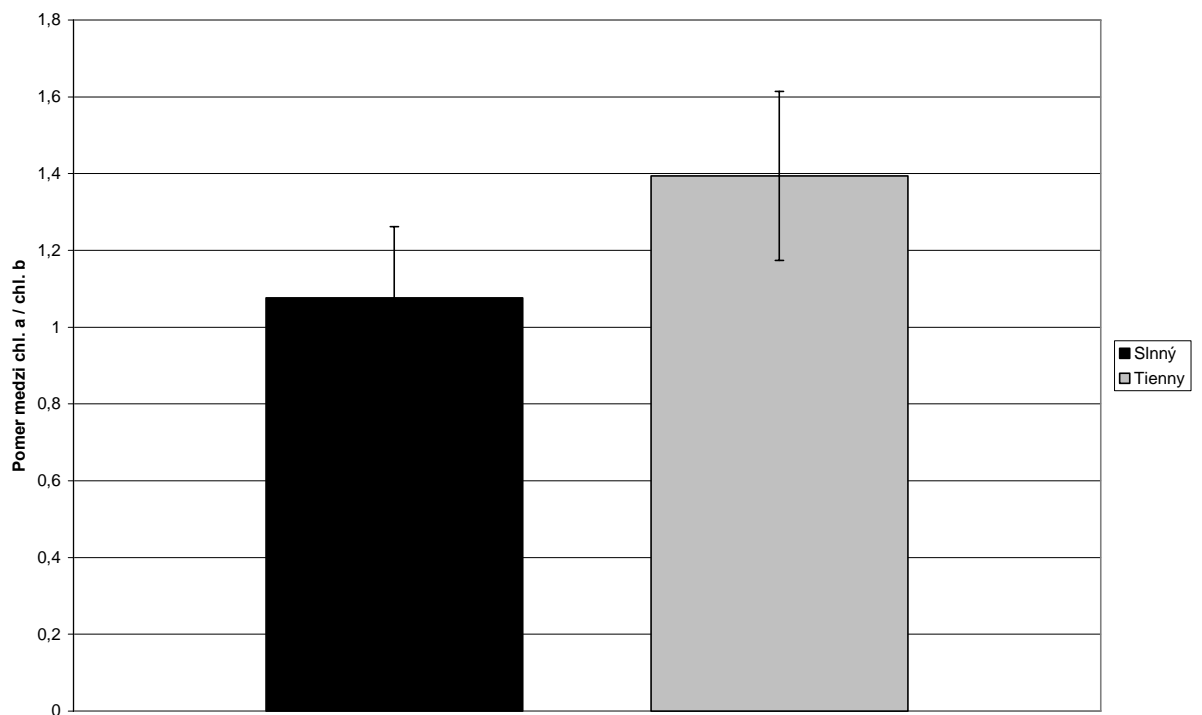
Graf 5 Koncentrácia chlorofylu *a* v slnných a tiennych ihliciach *Taxus baccata*.



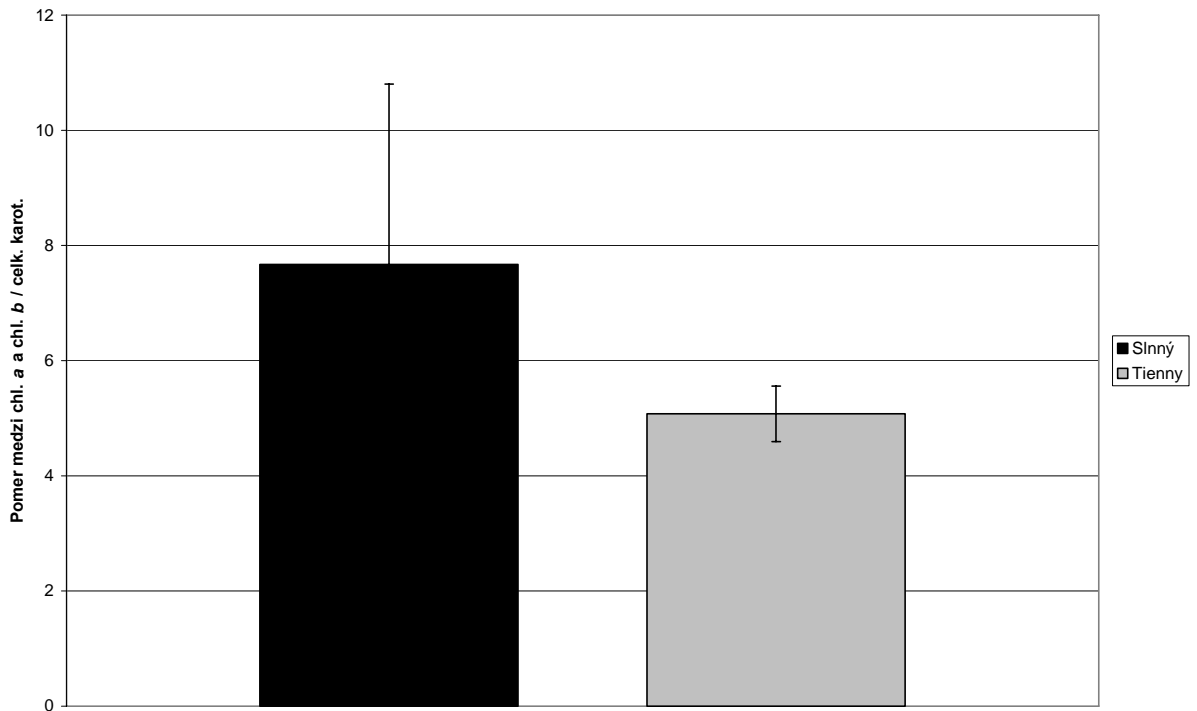
Graf 6 Koncentrácia chlorofylu *b* v slnných a tiennych ihliciach *Taxus baccata* L.



Graf 7 Koncentrácia celkových karotenoidov v slnných a tiennych ihliciach *Taxus baccata*.



Graf 8 Pomer medzi chl. *a* a chl. *b* v slnných a tiennych ihliciach *Taxus baccata* L.



Graf 9 Pomer chl. *a* a chl. *b* ku celkovým karotenoidom v slných a tienných ihliciach *Taxus baccata* L.

Pri vyrátaní pomeru chlorofylu *a* a chlorofylu *b* k celkovým karotenoidom v ihliciach *Taxus baccata*, ktorý je znázornený na grafe č. 9, sme zistili rozdiel medzi slnými a tiennými ihlicami o 43,90 % v prospech slných ihlíc. Avšak tento zistený rozdiel nie je signifikantne významný.

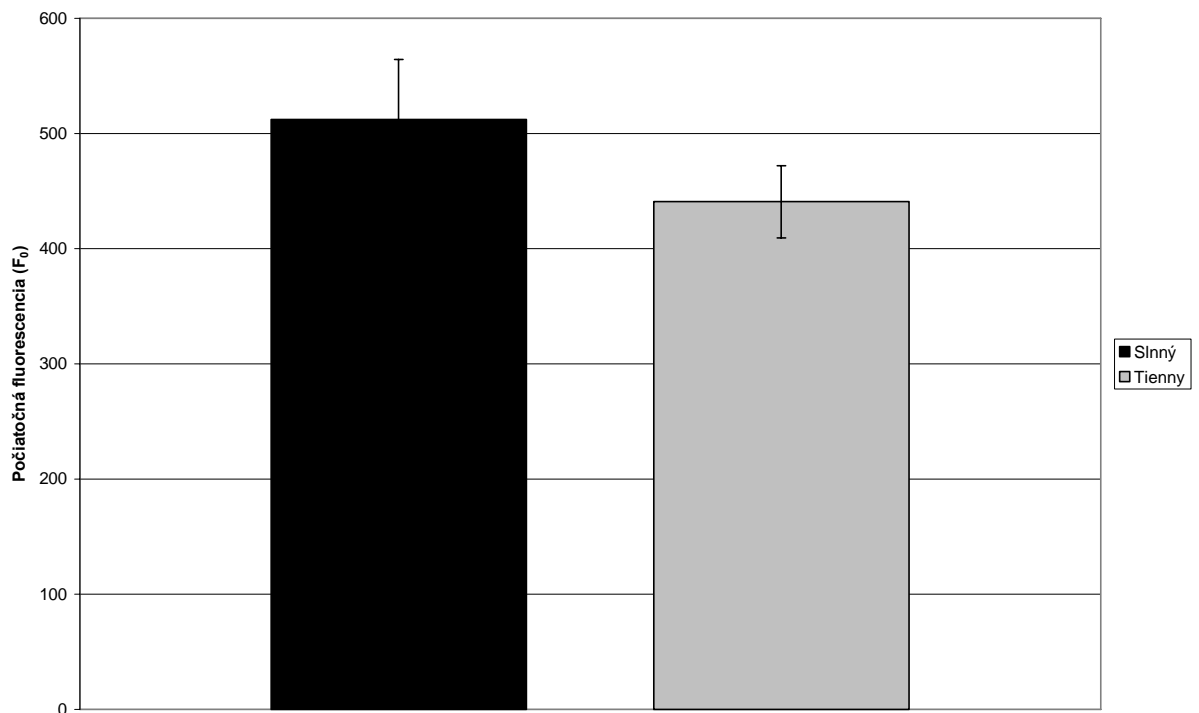
Ďalším meraným ekofyziologickým parametrom bolo meranie fluorescencie chlorofylov. Tento parameter sa využíva na monitorovanie fotochemických a nefotochemických procesov prebiehajúcich v PSII.

Pri našich pokusoch sme stanovovali počiatočnú fluorescenciu (F_0), ktorá je znázornená na grafe č. 10. Tieto hodnoty nám udávajú počiatočnú rýchlosť výmeny elektrónov a prenášania energie. Namerali sme vyššiu počiatočnú fluorescenciu v slných ihliciach $512,10 \pm 56,11$ absolútnej hodnoty ako v tienných ihliciach $440,80 \pm 31,30$ absolútnej hodnoty. Pri tomto stanovení sme nezistili výrazne štatisticky významné rozdiely.

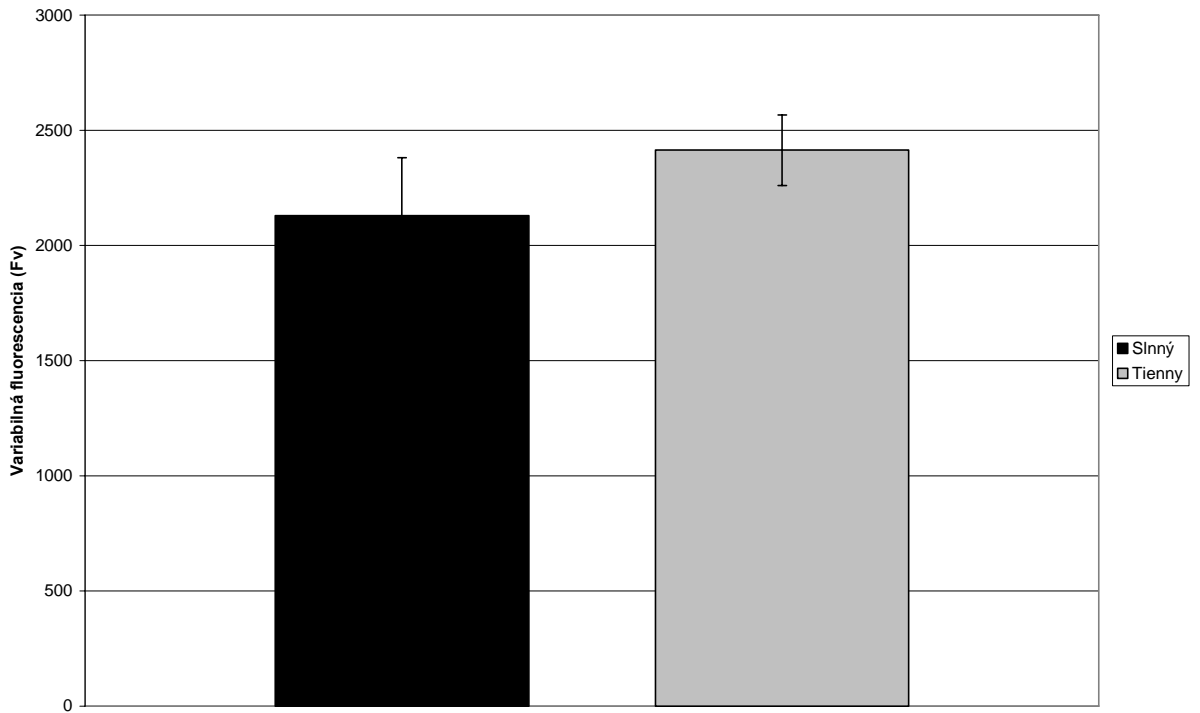
Pri meraní variabilnej fluorescencie (F_v) sme namerali nižšie hodnoty F_v v slných ihliciach než v tienných ihliciach (viď graf 11). F_v v tienných ihliciach bola vyššia o 13,32 %. Táto hodnota nebola signifikantne zvýšená. Avšak zníženie F_v

v slnných ihliciach mohlo byť zapríčinené fotoihnbíciou a tylakoidným poškodením. Táto fotoihnbícia v slnných ihliciach môže byť chronická, preto že *Taxus baccata* je tieňomilná rastlina, ktorá má obmedzenú kapacitu pre aklimatizáciu na vysoké svetelné žiarenie, taktiež to môže znamenať zvýšenú aktivitu PSII v tienných ihliciach, ako to popísal v smrekoch a boroviciach Lundmark et al. 1984 (prevzaté z Mitchell, 1998).

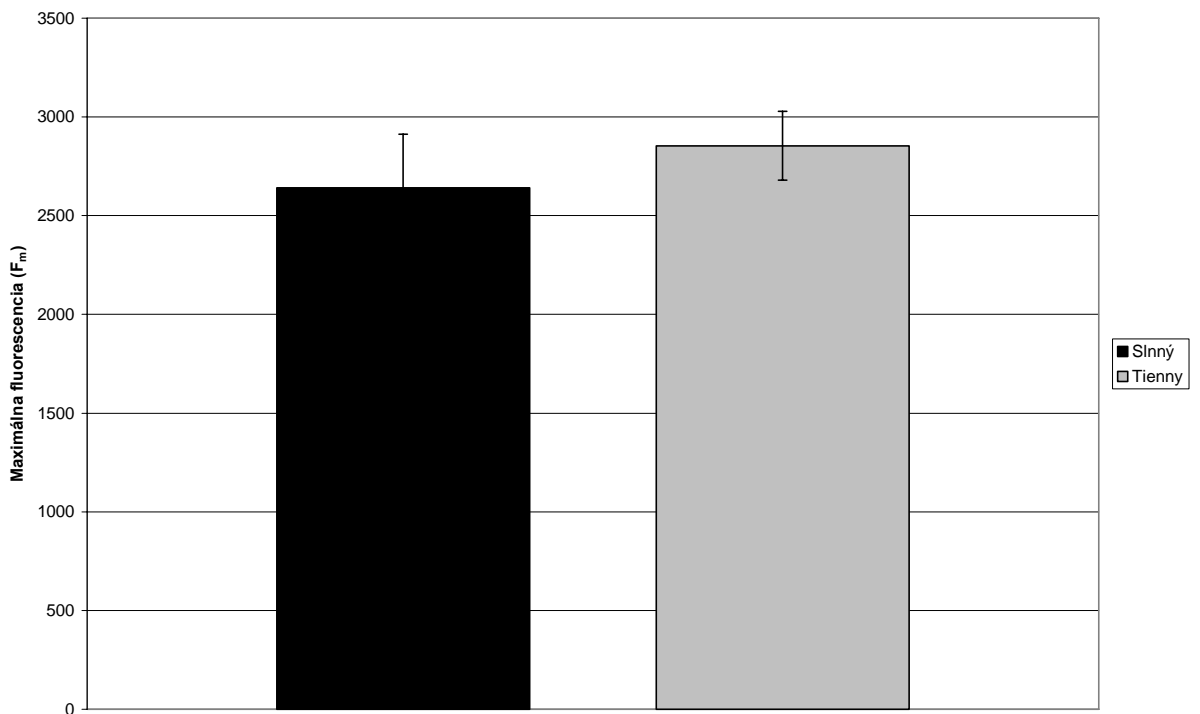
Pri meraní maximálnej fluorescence (F_m) sme zistili vyššie hodnoty v tienných ihliciach $2854,30 \pm 175,00$ absolútnej hodnoty ako v slnných ihliciach kde sa hodnoty pohybovali okolo $2641,90 \pm 270,60$ absolútnej hodnoty ako si to môžeme všimnúť na grafe č. 12.



Graf 10 Počiatočná fluorescencia v bode 0 meraná v slnných a tienných ihliciach *Taxus baccata* L.



Graf 11 Variabilná fluorescencia daná ako rozdiel maximálnej a počiatkovej fluorescencie meraná v slnných a tienných ihliciach *Taxus baccata* L.

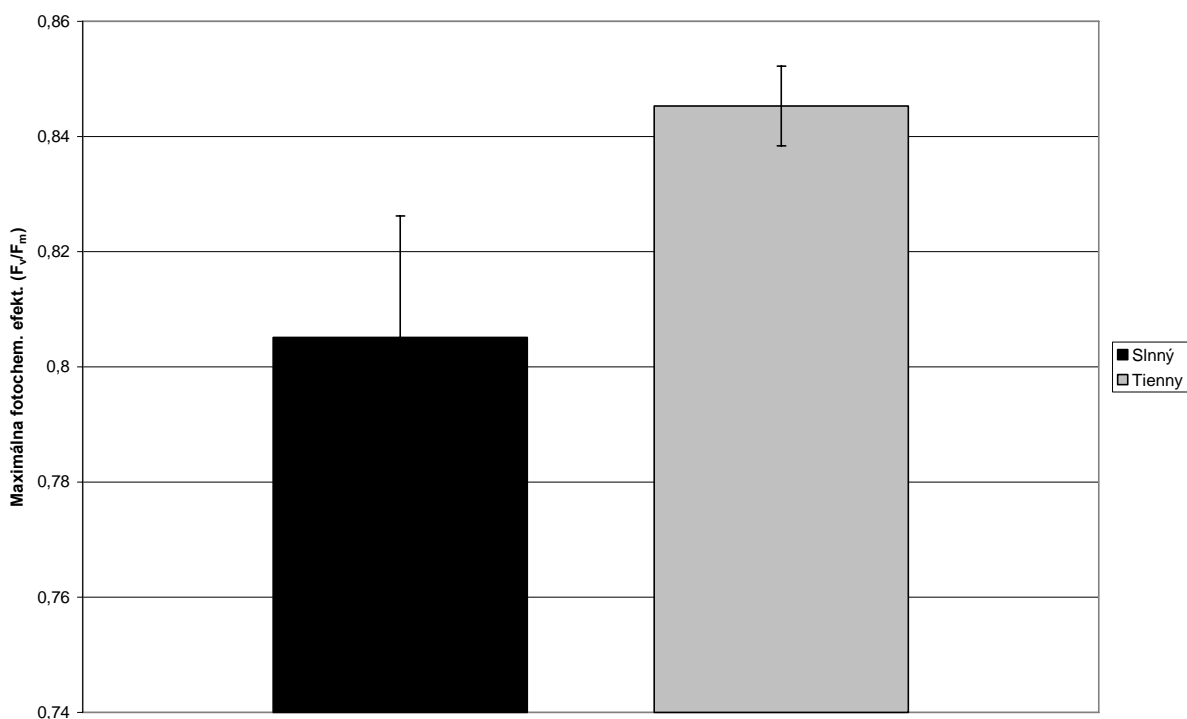


Graf 12 Maximálna fluorescencia nameraná v slnných a tienných ihliciach *Taxus baccaa* L.

Tento rozdiel bol iba o 8,00 % vyšší čo nebolo štatisticky významné. Tento rozdiel mohol byť zapríčinený tým, že tienne ihlice majú väčšie reakčné centrá ako slnné ihlice (Procházka et al., 1998).

Taktiež sme stanovovali maximálnu fotochemickú efektívnosť (F_v/F_m) čo je pomer variabilnej fluorescence k maximálnej fluorescencii. Vo všeobecnosti je tento znak považovaný za dobrý markrr fyziologického stresu v rastlinách, ktorý odráža stav a funkčnosť PSII (Kmet' et al., 2004).

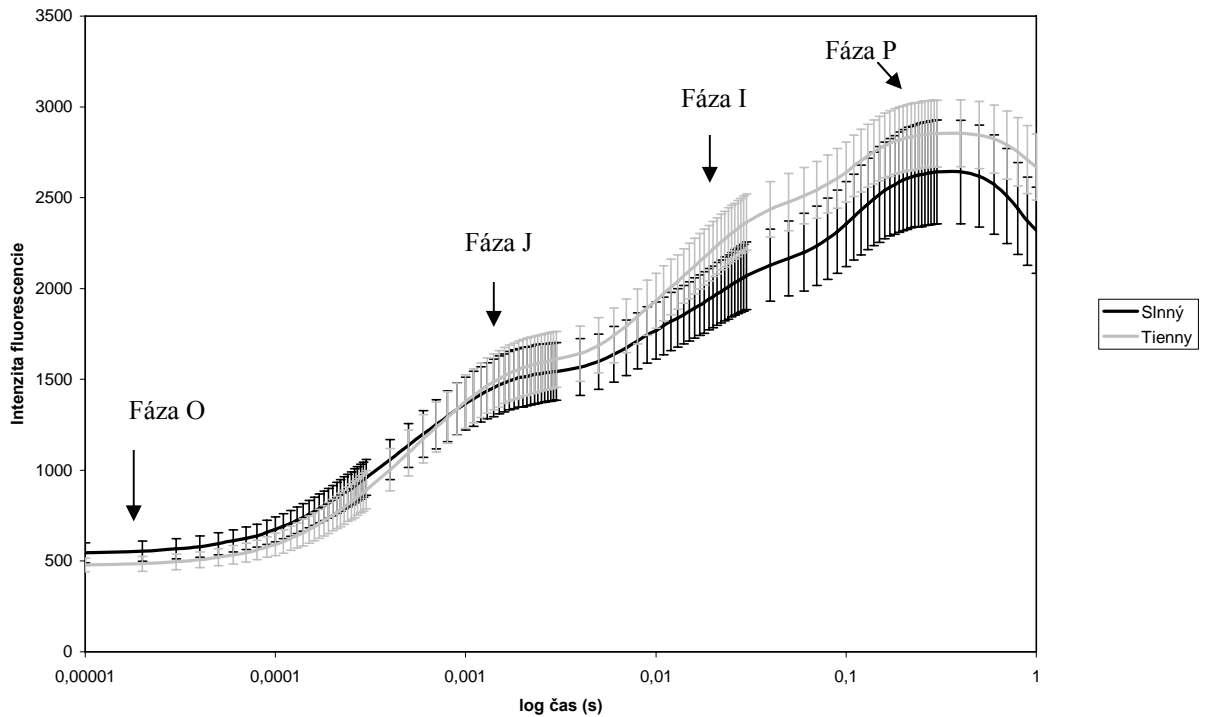
F_v/F_m bola taktiež vyššia v tiennych ihliciach a jej hodnoty sa pohybovali 84,53 % v tiennych ihliciach a 80,51 % v slnných ihliciach ako je to vidieť na grafe č. 13. Čo bolo o takmer 4 % menej oproti tiennym ihliciam. Tento rozdiel môžeme zdôvodniť taktiež veľkosťou a otvorenosťou reakčných centier PSII.



Graf 13 Maximálna fotochemická efektívnosť PSII nameraná v slnných a tiennych ihliciach *Taxus baccata* L.

Postupný nárast fluorescence chlorofylu *a* (viď. graf 14) vo fáze O – J odráža primárnu separáciu náboja v reakčnom centre fotosystému PSII. J Fáza je meraná v čase dvoch milisekúnd. Fáza J – I, ktorá nastáva v čase do 30 mlisekúnd po ožiarení aktinickým svetlom závisí na integrite fotosyntetických procesov a odráža prechod elektrónu s Q_A do Q_B . Fáza I – P odráža nefotocemickú disipáciu svetelnej energie

z fotosystému PSII (Lazar, 2006). Slnné ihlice vykazovali rýchlejší nárast indukovanej fluorescence v celej škále OJIP krivky, čo ukazuje na efektívnejšie využitie svetelnej energie vo fotochemických procesoch.



Graf 14 Kinetika indukovanej fluorescence znázornená krivkou OJIP.

Záver

Z tejto diplomovej práce s názvom „*Ekofyziologická charakterizácia tisu obyčajného (Taxus baccata L.)*“ vyplývajú nasledovné závery:

- Pri sledovaní rýchlosti kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* sme zaznamenali rozdiely medzi asimilačnými aparátmi jednotlivých typoch ihlíc. Medzi najvýznamnejšie parametre, ktoré odrážajú stabilitu tylakoidných membrán a citlivosť PSII na teplotu, patrí fotochemická efektívnosť F_v/F_m . Tento parameter bol signifikantne zvýšený v tienných ihliciach. Taktiež zaujímavým výsledkom bola hodnota F_v , ktorá tiež bola vyššia v tienných ihliciach. Táto hodnota nebola signifikantne zvýšená. Znížené hodnoty F_v v slnných ihliciach mohli byť zapríčinené práve citlivosťou PSII na fotoinhibíciu.
- Pri meraní koncentrácie asimilačných pigmentov sme dospeli k zaujímavým výsledkom, keď sme stanovili koncentráciu celkových karotenoidov. Zistili sme, že v tienných ihliciach bola signifikantne vyššia koncentrácia celkových karotenoidov ako v slnných ihliciach. Pričom sme predpokladali, že celkové karotenoidy budú zvýšené v slnných ihliciach, keďže karotenoidy sú antioxidantné farbivá a v slnných ihliciach dochádza k väčšiemu poškodeniu PSII. Avšak tento fakt sme pripísali vplyvu zimného obdobia na ihlice *Taxus baccata*.
- Taktiež pri našom meraní sme zaznamenali aj signifikantný rozdiel v listovej ploche (SLA), ktorá bola vyššia v slnných ihliciach a naopak štatisticky významný rozdiel v pomernej olistenosti (LAR), ktorá vyšla väčšia v tienných ihliciach.
- Pri sledovaní relatívneho obsahu vody (RWC), ktorý koreluje s celkovým obsahom vody v rastline sme nezistili žiadne signifikantné rozdiely medzi

slnnými a tiennymi ihlicami. Pomer medzi voľnou a viazanou vodou v slnných a tiennych ihliciach bol $1 : 0,98$ a tento pomer bol zanedbateľný a štatisticky nevýznamný.

Zoznam použitej literatúry

1. ANDERSON, J.M. 1986. Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. In: *Annual review of plant physiology*, roč. 37, 1986, s. 93-136.
2. ASADA, K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and elektron skins. In: *Philosophical Transaction of the Royal Society B: Biological Sciences*, roč. 355, 2000, s. 1419-1431.
3. ATKIN, O. K. – TJOELKER, G. M. 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. In: *Trends in plant science*, roč. 8, 2003, č. 7. s. 343-351.
4. ATKIN, O. K. – ZHANG, Q. – WISKICH T. J. 2002. Effect of temperature on rates of alternative and cytochrome pathway respiration ant their relationship with the redox poise of the quinone pool¹. In: *Plant Physiology*, roč. 128, 2002, s. 212-222.
5. BAILEY,S., - WALTERS, R.G., - JANSSON, S., - HORTON, P. 2001. Aclimation of *Arabidipsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. In: *Planta*, roč. 213, 2001, s. 794-801.
6. BAKER, R. N., - HARBINSON, J. - KRAMER, M. D. 2007. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. In: *Plant, Cell and Enviroment*, roč, 30, 2007, s. 1107-1125.
7. BALOGLU, E. - KINGSTON, D. G. I. 1999. The Taxana Diterpenoids. In: *Journal of Natural Products*, roč. 62, č. 10, 2007, s. 1448 – 1472.
8. BŔHMOVÁ, B. 1988. *Genetické základy rastlinného šľachtiteľstva*. Univerzita Komenského, Bratislava, 1988, s 55 – 57.
9. BOHUŠ, J. 1984. *Tis vo veľkej Fatre*, Martin : Osveta, 1984. 37 s.
10. BURKHARDT, J. – KAISER, H. – KAPPEN, L. – GOLDBACH, E. H. 2001. The possible role of aerosols on stomatal conductivity for water vapour. In: *Basic and Applied Ecology*, roč. 2, 2001, s. 351-364.

-
11. BURKOVSKÝ, J. 1998. Tis, prastará a tajomná drevina. In: *Enviromagazín*, roč. 3, 1998, č. 6, s. 22 – 23.
 12. CALDWELL, A. M. – TERAMURA, M. T. – BORNMAN, J. F. – BJORN, L. O. – KULANDAIVELU, G. 1995. Effect of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. In: *Ambio*, roč. 24, 1995, s. 166-173.
 13. CANNELL, M. G. R. – THORNLEY, J. H. M. 2000. Modelling the Components of Plant Respiration: Some Guiding Principles. In: *Annals of Botany*, roč. 85, 2000, s. 45-54.
 14. COLIN, H. 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. In: *Plant growth regulation*, roč. 34, 2001, s. 119 – 134.
 15. ČÍŽOVÁ, M. - REGEC, E. 1993. Tis obyčajný (*Taxus Baccata* L.) v navrhovanej ŠPR Kamienska Tisina v Pieninách. *Taxus baccata* in Pieniny. In *Prehľad odborných výsledkov XVI. VsTOP. OV SZOP Poprad*, 1993. s. 94 – 96.
 16. DEMAIN, A. L. 1990. Achievements in microbial technology. In: *Biotechnology Advance*, roč. 8, 1990, s. 291 – 301.
 17. FILOVÁ, A. - MIKLAŠOVÁ, K. 2006. Faktory ovplyvňujúce proces kolagenézy tisu (*Taxus* spp.) v podmienkach *in vitro*. In: *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2006*. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006, s 104 – 106 ISBN 80-213-1484-2.
 18. FILOVÁ, A. 2004. *Produkčná fyziológia zahradníckych rastlín*, Nitra : SPU, 2004. 46 s.
 19. FRENSE, D. 2007. Taxanes: perspectives for biotechnological production. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol*, roč. 73, 2007, s. 1233 – 1240.
 20. GOLDSTEIN, G. – NOBEL, P.S. 1994. Water relations and low-temperature acclimation for cactus species varying in freezing tolerance. In: *Plant physiology*, roč. 104, 1994, s. 675-681.
 21. GONZÁLES, A. J. – ROSA, M. – PARRADO, F. M. – HILAL, M. – PRADO, E. F. 2009. Morphological and physiological responses of two varieties of a highland species (*Chenopodium quinoa* Willd.) growing under near-ambient and strongly reduced solar UV-B in a lowland location. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, roč. 96, 2009, s. 144-151.
 22. GRAGG, G. M. - BOYD, M. R., et al. 1999. International collaboration in drug discovery and development. In: *Pure Applied Chemistry*, 1999. s. 1619 – 1633.

-
23. GUO, B. H.; et al. 2006. Taxol synthesis. In: *African Journal of Biotechnology*, roč. 5, 2006, s. 15 – 20. ISSN 1684-5315.
 24. HANSEN, R. C. 1999. *Taxus and Taxol A Compilation of Research Findings*. Ohio: State University, 1999. 68 s. 330-263-3700
 25. HIEKE, K. 1978. *Praktická dendrologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1978. 533 s.
 26. IVANOV, A. G. – SANE, P. V. – ZEINALOV, Y. – SIMIJEV – I. – HUNER, N. P. – OQUIST, G. 2002. Seasonal responses of photosynthetic electron transport in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) studied by thermoluminescence. In: *Planta*, roč. 215, 2002, s. 457-465.
 27. JAHNKE, S – KREWITT, M. 2002. Atmospheric CO₂ concentration may directly affect leaf respiration measurement in tobacco, but not respiration itself. In: *Plant, Cell and Environment*, roč. 25, 2002, s. 641-651.
 28. JACH, M. E. – CEULEMANS, R. 1999. Effects of elevated atmospheric CO₂ on phenology, growth and crown structure of Scot pine (*Pinus sylvestris*) seedlings after two years of exposure in the field. In: *Tree Physiology*, roč. 19, s. 289-300.
 29. JURČÁK, S. - ŠTLAMACH, V. 1997. *Opäť o tisoch. Naše liečivé rastliny*. Martin: Osveta, 1997. s. 12 – 13.
 30. KARASOVÁ, E. 1995. *Osobitne chránené územia: Slovenský kras*. Martin: Osveta, s. 418 – 432.
 31. KETCHUM, R. E. B. - CROTEAU, R. B. The Taxus Metabolome and the Elucidation of the Taxol Biosynthetic Pathway in Cell Suspension Cultures. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, roč. 57, 2006, s. 291 – 309.
 32. KINGSTON, D. G. I. 2005. Taxol and Its Analogs. In: *Anticancer Agents from Natural Products*, 2005, s. 89 – 122.
 33. KMEŤ, J. – DITMAROVÁ, Ľ. – STŘELCOVÁ, K. 2004. Fyziologické aspekty zdravotného stavu buka (*Fagus sylvatica* L.) vo vzťahu k stresu zo sucha. In: *B. Šiška (ed.): Climate change-weather extremes organism and ecosystems. Bioclimatological Work-shop*, 2004, Viničky. CD Proceedings, 6 s.
 34. KORPEL, Š. 1995. *Výskum tisú v lesných ekosystémoch Slovenska a možnosti zlepšenia jeho stavu*, Banská Bystrica: Vydavateľstvo SAŽP, 1995. 65 s.
 35. KORPEL, Š., 1996. *Združenie „Priatelia tisú“ : Chránené územia Slovenska*. Banská Bystrica: Vydavateľstvo SAŽP, 1996, 45 s.

-
36. KOVÁČ, J. 1995. *Explantované kultury rostlin*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995, 142 s., ISBN 80-7067-493-8
37. KRÚLOVÁ, J. 2007. *Biochemické a fyziologické markery antropogenního stresu* : Dizertačná práca. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 65 s.
38. LARCHER, W. 1984. *Ökologie der Pflanzen*. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co., 1984, 384 s.
39. LARIGAUDERIE, A. - KÖRNER, Ch. 1995. Acclimation of dark respiration to temperature in alpine and lowland plant species. In: *Annals of Botany*, roč. 76, 1995, s. 245-252.
40. LAZAR, D. 2006. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. In: *Functional Plant Biology*, roč. 33, 2006, s. 9-30.
41. LICHTENHALER, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in enzymology*, roč. 148, 1987, s. 350-382.
42. LUKÁČIK, I. - NIČ, J. 1995. *Výskyt a zdravotný stav Taxus baccata v Štátnej prírodnej rezervácii Becherovská tisina*. Zborník referátov z konferencie „Dřeviny – bohatství a krása naší krajiny“. Brno: MZLU, 1995 s. 43 - 47
43. LUKÁČIK, I. - NIČ, J. 1996. *Workommen Ökologische profilierung der waldgesellschaften und gesundheitszustand der eibe auf dem gebiet des „Strážovské vrchy“* , Der eibenfreude 3/96, Eibenfreunde f.v. Scheeder, 1996. s. 38 – 39.
44. LUSHNIKOV, A. A. – VESALA, T. – KULMALA, M. – HARI, P. 1994. Semiphenomenological model for stomatal gas transport. In: *Journal of Theoretical Biology*, roč. 171, 1994, s. 291-301, ISSN : 0022-5193.
45. MASAROVICOVÁ, E. - REPČÁK, M. 2002. *Fyziológia rastlín*. Bratislava, Univerzita Komenského, 2002, 303 s.
46. MELIS, A. 1991. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. In: *Biochimica et biophysica acta*, 1991, č. 1058, s.87-106.
47. MICHALÍK, I. 1987. *Biochémiia rastlín*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1987, 360 s.
48. MITCHELL, A. K. 1998. Acclimation of Pacific yew (*Taxus brevifolia*) foliage to sun and shade. In *Tree physiology*, roč. 18, 1998, s. 749 – 757.
49. NOVÁK, F. J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Praha : Academia, 1990. 208 s., ISBN 80-200-0344-4
-

-
50. PAGAN, J. - RANDUŠKA, D. 1987. *Atlas drevín I*. Bratislava: Obzor, 1987. 360 s., 65-013-87
 51. PAGANOVÁ, V. 2001. *Základy dendrológie*. Nitra: SPU, 2001. 197 s. ISBN 80-7137-937-9
 52. PARK, Y.I., - CHOW, W.S., - ANDERSON, J.M. 1997 Antenna size dependency of photoinactivation of photosystem II in light acclimated pea leaves. In: *Plant physiology*, roč. 115, 1997, s. 151-157.
 53. PAVLOVÁ, L., 2005. *Fyziologie rostlin*. Praha: Karolinum, 2005, 253 s. ISBN 80-246-0985
 54. PORRA, R. J. – THOMPSON, W. A. – KRIEDEMANN, P. E. 1989. Determination of accurate excitation coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. In: *Biochemica et biophysica Acta*, roč. 975, 1989, s. 384-394.
 55. PROCHÁZKA, S.; - MACHÁČKOVÁ, I.; - KREKULE, J.; - ŠEBÁNEK, J. 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998, 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
 56. PŠENÁKOVÁ, I - FARAGÓ, J. - VAŠKOVÁ, L. 2003. Možnosti využitia rastlinných *in vitro* systémov pre produkciu sekundárnych metabolitov. In: *Nova biotechnologica*, roč. 3b, 2003, s. 103 – 113.
 57. RAO, S.M. - RAVISHANKAR, G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites In: *Biotechnology advances*, roč 20, 2002, s. 101 – 153.
 58. ROBERTZ, P. – STOCKFORS, J. 1998. Effects of elevated CO₂ concentration and nutrition on net photosynthesis, stomatal conductance and needle respiration of field-grown Norway spruce trees. In: *Tree Physiology*, roč. 18, 1998, s. 233-241.
 59. SELLIN, A. 2001. Morphological and stomatal responses of Norway spruce foliage to irradiance within a canopy depending on shoot age. In: *Environmental and Experimental Botany*, roč. 45, 2001, s. 115-131.
 60. SELLIN, A., KUPPER, P. 2005. Variation in leaf conductance of silver birch: effects of irradiance, vapour pressure deficit, leaf water status and position within a crown. In: *Forest Ecology and Management*, roč. 206, 2005, s. 153-166.
 61. SEMAN, I. 1990. Biotechnologické metody v šlechtění polních plodin. Příroda, Bratislava, 1990, 269 s.
-

-
62. SLICHENMYER, W. J. - VON HOFF, D. D. 1990. New Natural Products in Cancer Chemotherapy. In: *J. Clin. Pharmacol*, roč. 30, 1990, s. 770 – 788.
63. STRASSER, R. I. – SRIVASTAVE, A, 1995. Polyphasic chlorophyll II *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. In: *Photochemistry and Photobiology*, roč. 61, 1995, s. 32-42.
64. STROBEL, G., et al. 1996. Taxol from endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. In: *Microbiology*, roč. 142, 1996, s. 435 – 440.
65. ŠETLÍK; - SEIDLOVÁ; - ŠANTRÚČEK. 2010. Fyziologie rostlin. Učebné texty Jihočeské Univerzity [online]. 2010 [cit. 2010-03-26]. Dostupné na internete: <<http://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html>>
66. TANAKA, A. 2007. Photosynthetic activity in winter needles of the evergreen tree *Taxus cuspidata* at low temperatures. In *Tree physiology*, roč. 27, 2007, s. 641 – 648.
67. THOMAS, B. R. – GRIFFIN, L. K. 1994. Direct and indirect effect of atmospheric carbon dioxide enrichment on leaf respiration of *Glycine max* (L.) Merr. In: *Plant Physiology*, roč. 104, 1994, s. 355-361.
68. VALACHOVÁ, M. - MÚČKOVÁ, M. - ŠTURDÍKOVÁ, M. 2007. Metabolity endofytických mikroorganizmov ako biologicky účinné látky. In: *Chemické listy*, č. 101, 2007, s. 486 -494.
69. VALACHOVIČ, P. 1998. Tis, prastará a tajomná drevina. In: *Enviromagazín*, roč. 3, 1998, č. 6, s. 22 – 23.
70. VOET, D. – VOETOVA, J.G. 1995. Fotosyntéza. In : *Biochemie*, Eds: Voet, D. – Voetová, J.G. Victoria Publ., Praha, 1995, 658-691 p.
71. VREŠTIAK, P. - OSVALD, O. 1994. *Všetko o ihličnanoch*. Bratislava: Slovart, 1994. 96 s. ISBN 80-7145-126-6
72. YUAN-GANG ZU, - HAI-HE PANG, - JING-HUA YU, - DE-WEN LI, - XIAO-XUE WEI, et al., 2010. Responses in the morphology, physiology and biochemistry of *Taxus chinensis* var. *Mairei* grown under supplementary UB-B radiation. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, roč. 98, 2010, s. 152-158.
73. Obrázok, priečny rez koreňom, Encyklopaedia Britannica, Inc, 1994. [cit. 2010-4-05]. Dostupné na internete: <http://www.progressivegardens.com/growers_guide/root1.jpg>
74. Dostupné na internete: [cit. 2007-2-14]. <<https://www.yamadori-bonsai.de>>
-