

Vodní režim rostlin

- **Mechanismy pohybu průduchů**
 - Obecné charakteristiky
 - Reakce průduchů na světlo
 - Reakce průduchů na vodní stres
 - Reakce průduchů na vlhkost vzduchu
 - Reakce průduchů na CO₂
 - Reakce průduchů na ostatní faktory

Pohyby průduchů

- Otevírání průduchů:
 - snížení osmotického potenciálu svěracích buněk transportem iontů z apoplastu do svěracích buněk a produkcí osmoticky aktivních látek → transport vody do svěracích buněk → zvýšení tlakového potenciálu → otevření průduchů
- Zavírání průduchů:
 - zvýšení osmotického potenciálu svěracích buněk transportem iontů ze svěracích buněk do apoplastu → transport vody ze svěracích buněk → snížení tlakového potenciálu → zavření průduchů
- Hlavním transportovaným kationtem je K^+ , aniontem Cl^- . Transport přes plasmalemu i tonoplast. Hlavním produkovaným aniontem je malát. Může se podílet i sacharóza.

Transport ionů membránou

Obecně transport ionů membránou - selektivními kanály. Často odlišné kanály pro transport ionů dovnitř a ven.

Rychlost závisí na

- 1) membránovém potenciálu
- 2) koncentraci transportovaného iontu
- 3) koncentraci jiných iontů nebo molekul
- 4) strukturních modifikacích díky fosforylaci či defosforylaci proteinů
- 5) mechanickém napětí

Schema vpravo: Buchsenschutz *et al.* 2005

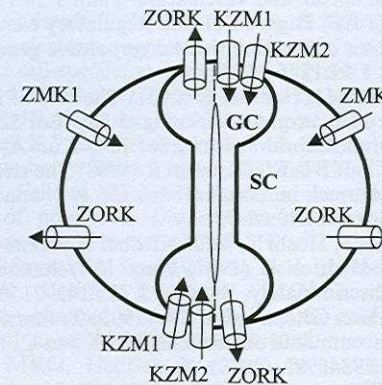


Fig. 7 Schematic diagram of the K^+ channel genes expressed within the stomatal complex of maize composed of two subsidiary cells (SC) and two guard cells (GC). Note that guard cells of grasses are interconnected via perforations in the polar parts of their ventral walls (Sack 1987). The direction of the channel-mediated ion fluxes is indicated by arrows.

Hlavní kanály transportu iontů ve svěracích buňkách

Fig. from Schroeder *et al.* 2001.

Plasmalema , tonoplast – iontové kanály

K^+ _{in}, K^+ _{out}, Ca^{2+} _{in}

aniontové kanály R-tyt a S-tyt

Na expresi proteinů iontových kanálů se účastní řada genů, např.

K^+ _{in}: *KAT1*, *KAT2*, *AKT1*, *AKT2/3*

K^+ _{out}: *GORK*, *TPK1*

Ca^{2+} _{in}: *CPK*

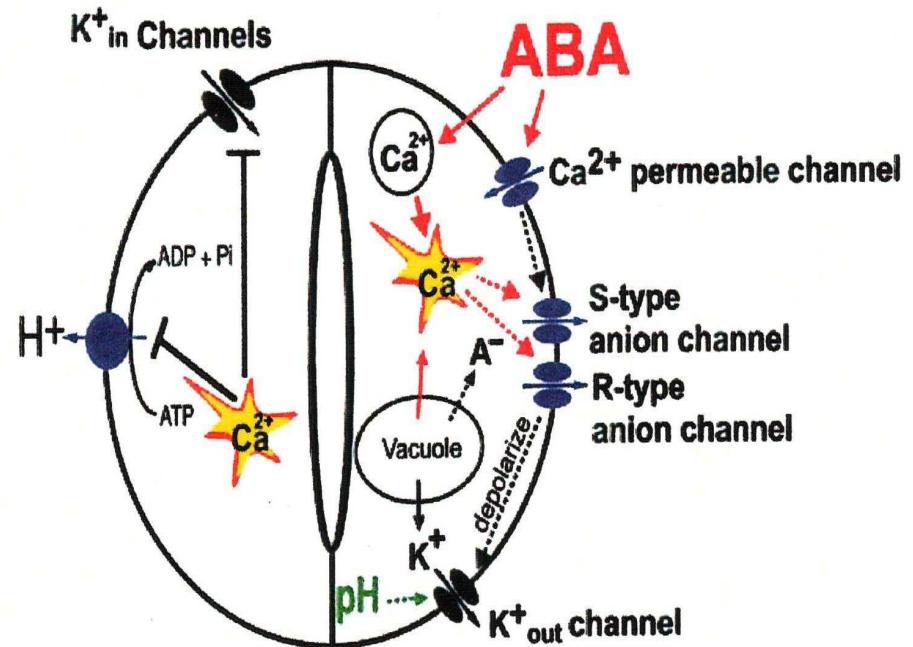
R-tyt:

S-tyt: *SCAC1*, *SLAH*

Hyperpolarizace a depolarizace membrán

– H^+ -ATPáza (*AHA1*, *OST2*)

(Kim *et al.* 2010)



Reakce průduchů na ozáření - hlavní faktor působící otevírání průduchů

- Modrá i červená část spektra viditelného světla může působit přímo na svěrací buňky
- Receptorem modrého světla jsou:
 - Fototropiny (phot1, phot2) situované převážně v plasmalemě.
 - zeaxanthin v chloroplastech (interakce světlo a CO₂ concentration).
- Mechanismus:
 - aktivace ATPázy fosforylací C-terminálu \Rightarrow aktivní transport H⁺ do apoplastu \Rightarrow polarizace membrány (elektrický potenciál asi -120 mV) \Rightarrow aktivace selektivních membránových kanálů pro transport K⁺ dovnitř svěracích buněk (K⁺_{in}). Doprovodným anionem je obvykle Cl⁻.
- Výrazně vyšší citlivost průduchů k modré části spektra což se uplatňuje při otevírání průduchů po rozednění.
- CAM rostliny – cirkadiální rytmus

Receptorem modrého světla je zeaxantin v chloroplastech svěřacích buněk nebo fototropiny. Po excitaci světlem je signál přenášen do cytoplazmy kde aktivuje serin/treonin kinázu. Tato kináza aktivuje ATPázu a stimuluje transport $H^+ \Rightarrow K^+_{in}$. Zeaxanthin vzniká při deepoxidaci violaxantinu (xantofylový cyklus). Koncentrace zeaxantinu závisí na rychlosti transportu elektronů a spotřebě ATP a NADPH při fixaci CO_2 . Tím koncentrace CO_2 může ovlivnit reakci průduchů na světlo. (Zeiger, E. Trends Plant Sci. 5: 183, 2000, Shimazaki *et al.* 2007)

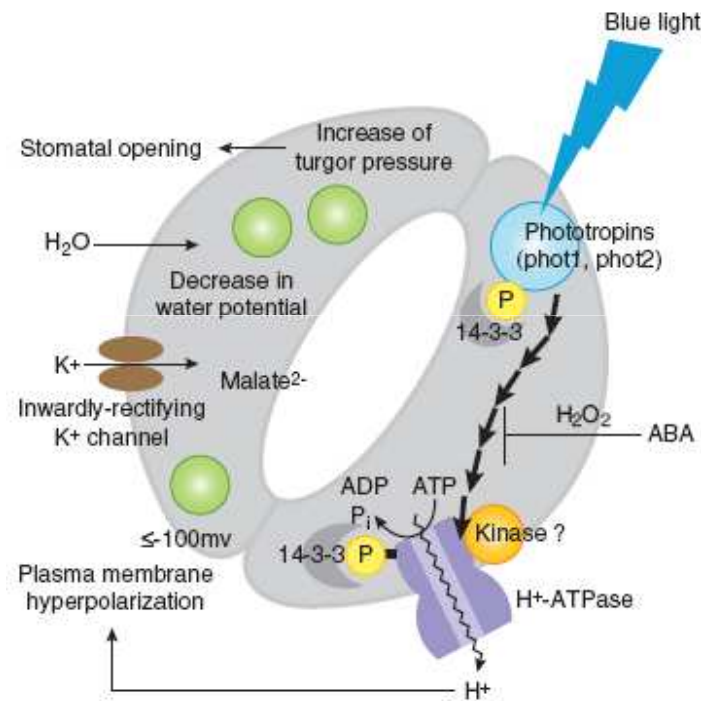
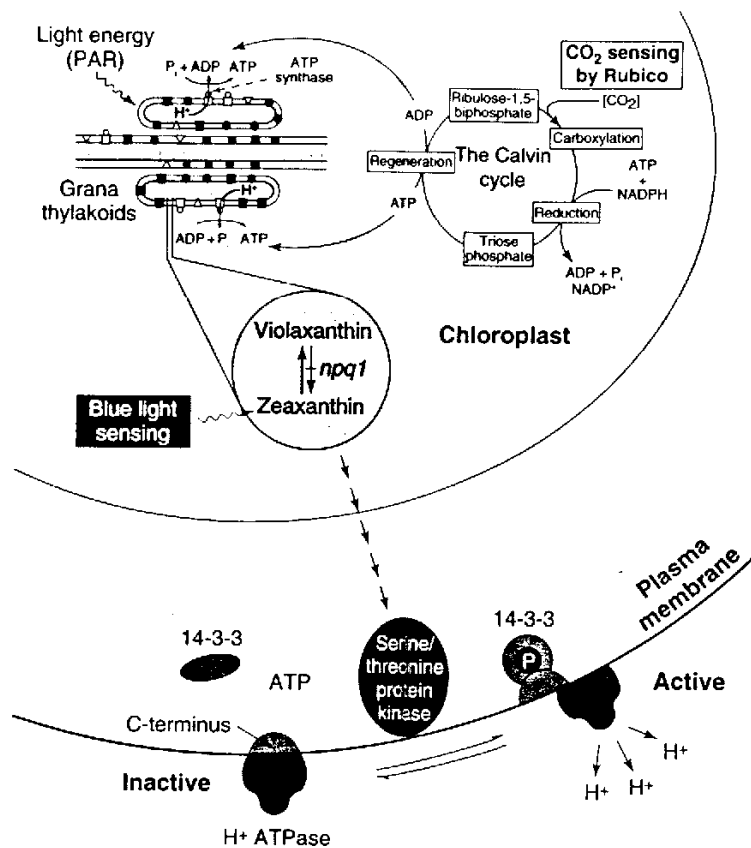


Figure 2
Processes of stomatal opening in response to blue light.

Modré světlo nejprve indukuje fosforylaci treoninu (Thr₉₅₀) na C terminálu. Pro aktivaci H⁺-ATPázy je však nezbytná ještě vazba proteinu 14-3-3.

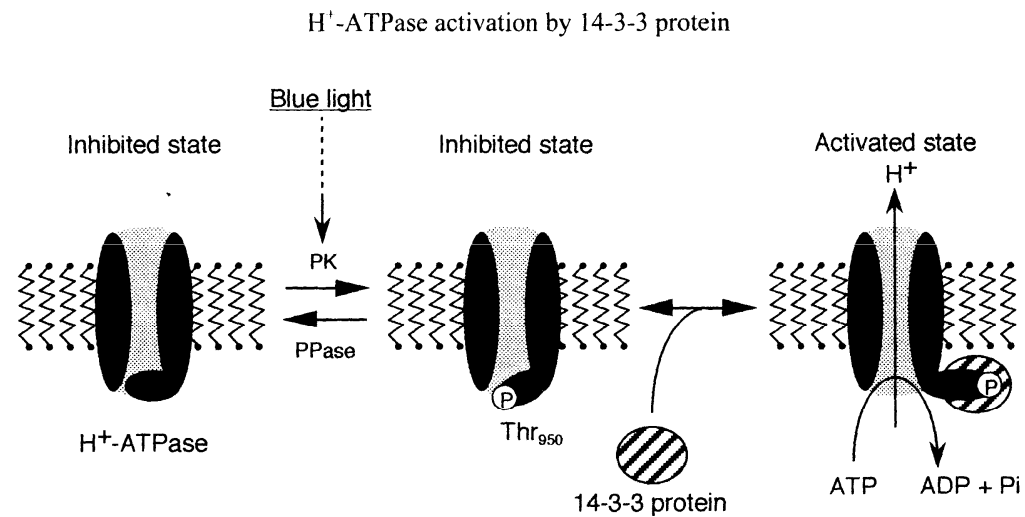


Fig. 5 Activation mechanism of the plasma membrane H⁺-ATPase in response to BL in stomatal guard cells. PK and PPase indicate protein kinase and protein phosphatase, respectively. P indicates the phosphorylated Thr₉₅₀ residue.

Působení červeného světla

Receptorem červeného světla jsou chloroplasty

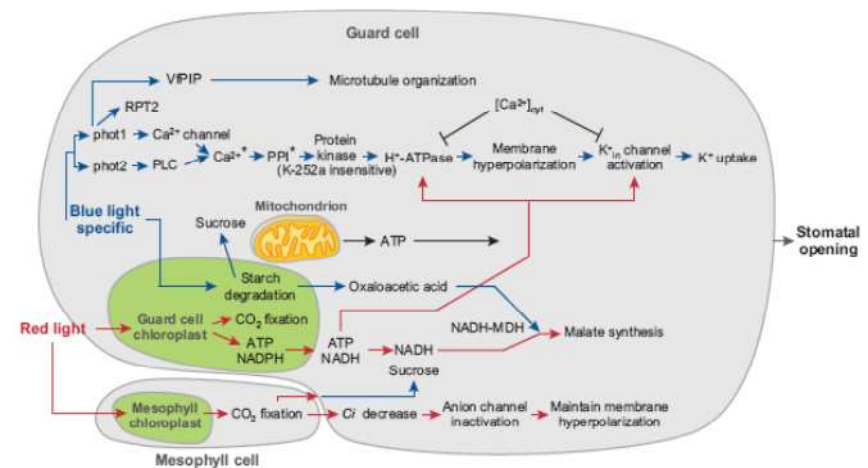
Mechanismus:

indukce fotosyntézy chloroplastů svěřacích buněk
cyklická fotofosforylace (zdroj ATP)

aktivace PEPC (karboxylace PEP, vzniklého rozkladem škrobu, na oxalacetát, který je redukován na malát).

akumulace sacharózy

Světlo může působiti nepřímo - indukovat fotosyntézu buněk mezofylu a tím snížení vnitřní koncentrace CO_2 . Také produkované monosacharidy mohou být transportovány do svěřacích buněk a přeměněny na sacharózu.



Změny parametrů fluorescence chlorofylu v závislosti na ozáření ve svěřacích buňkách průduchů a v mezofylových buňkách (Lawson *et al.* 2002)

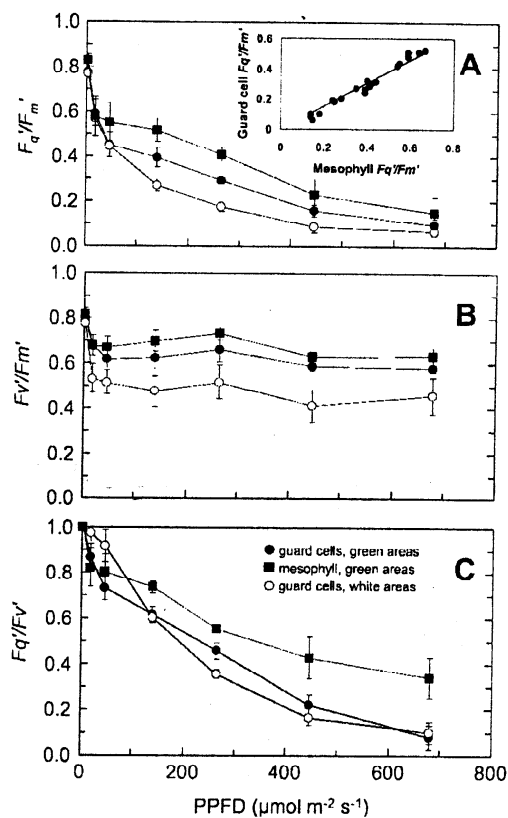


Figure 4. Responses of the fluorescence parameters F_q'/F_m' (A), F_v'/F_m' (B), and F_q'/F_v' (C) of a variegated tradescantia leaf to increasing PPFD. Data were obtained from guard cells in white (○) areas of the leaf and from mesophyll (■) and guard cells (●) in green areas. Measurements were made at 25°C and a C_a of 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Data are the means of six replicates \pm SE. The inset in A shows the relationship between F_q'/F_m' for mesophyll and guard cells in green areas of the leaf over the range of PPFDs (the linear relationship is defined by $y = 0.76x$; $r^2 = 0.92$).

F_0 - základní fluorescence, F_m - maximální fluorescence, F_v - variabilní fluorescence ($F_v = F_m - F_0$) u rostlin adaptovaných ve tmě a F'_0 , F'_m a F'_v - totéž u rostlin na světle; $F'_q = F'_m - F'$ - fluorescence měřená těsně před aplikací saturačního pulzu; F'_q/F'_m - kvantová účinnost PS 2 v době měření, F'_v/F'_m - maximální kvantová účinnost, F'_q/F'_v - fotochemické zhášení

NPQ - nefotochemické zhášení, PL - fosfolipáza, PP - fosfatázy proteinů, InsP₃ - inositol-3-fosfát

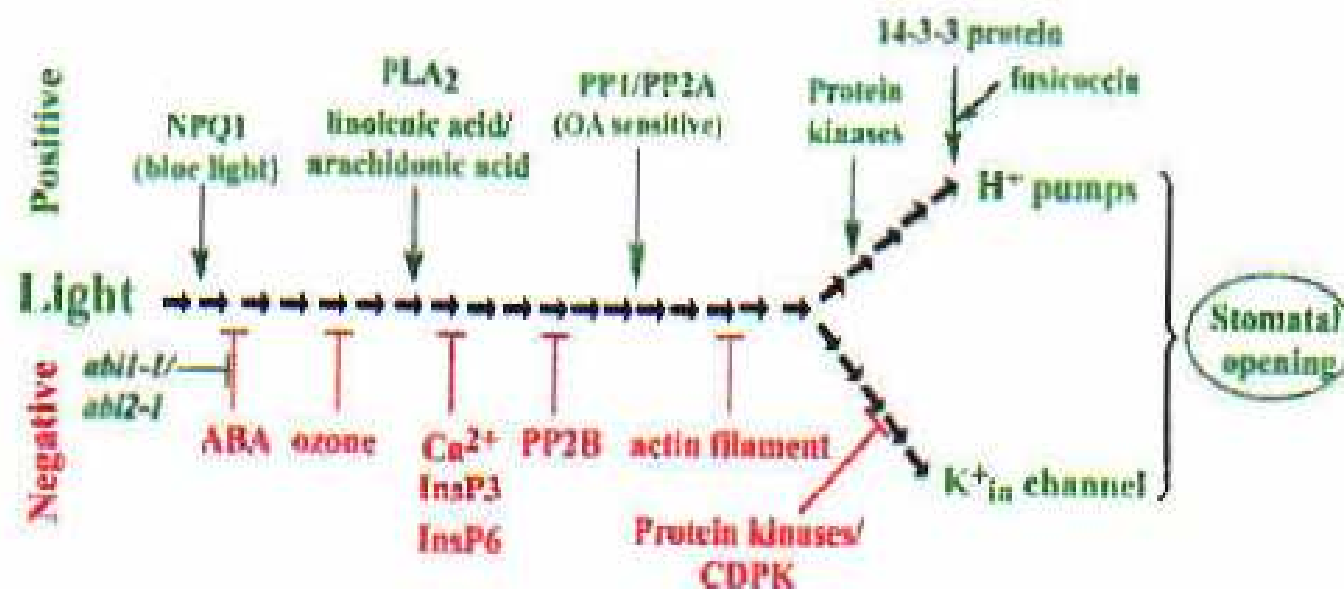


Figure 1 A simplified working model for proposed functions of positive and negative regulators in light-induced stomatal opening. Positive (in green, *top*) and negative regulators (in red, *bottom*) of light signaling in guard cells are shown. The sequence of events and epistasis among regulators remain largely unknown and requires further genetic, biochemical, and cellular signaling analyses. For simplicity, parallel signaling branches are not included here (see text for details).

Reakce průduchů na vodní stres - hlavní faktor působící zavírání průduchů

vodní deficit v listovém mezofylu

může být v důsledku nízké vlhkosti vzduchu, nízkého obsahu vody v půdě, zasolení, nízké teploty

hydraulické signály (*přímý vliv*):

obsah vody ve svěracích buňkách

obsah vody v epidermálních buňkách

tlakový potenciál v xylému

chemické signály (*nepřímý vliv*):

pozitivní nebo negativní: ABA, jiné fytohormony, minerální ionty, polyaminy (spermidin, spermin, putrescin, kadaverin), sfingosin-1-fosfát, H₂O₂, NO

Snižováním obsahu vody v listu díky zvýšené rychlosti transpirace se zvyšuje i koncentrace ABA v apoplastu a proto při snížení vodního potenciálu se "zvyšuje citlivost" průduchů na ABA

Ovlivnění transportu K⁺ změnou tlakového potenciálu - mechanický vliv

ABA

ABA je stresový hormon a umožňuje komunikaci mezi kořeny a nadzemní částí rostlin

Syntéza ABA v listech i v kořenech, prekursorů ABA jsou karotenoidy.

- 9'-*cis*-violaxanthin nebo 9'-*cis*-neoxanthin → xanthoxin (9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenáza; NCED; *AtNCED2,3,5,6,9*).
- xanthoxin → aldehyd kyseliny abscisové (xanthoxin oxidáza; *AtABA2*).
- aldehyd kyseliny abscisové → ABA (ABA aldehyd oxidáza; *AAO3*)

Distribuce xylém, floem, apoplast i symplast (ve formě volné ABA nebo konjugátů), závisí na pH.

Degradace – přeměna na kyselinu fazeovou a dihydrofazeovou

Koncentrace ABA v xylému bývá 10 nmol dm⁻³, při stresu až 3 μmol dm⁻³.

Pro reakce průduchů je významná **koncentrace ABA v apoplastu v okolí svěřacích buněk**.

ABA je uvolňována ze symplastu mezofylu a transportována xylémem z kořenů. Dochází k rozkladu konjugátů díky zvýšené koncentraci β-glukosidázy.

ABA též zvyšuje permeabilitu kořenů, ovlivňuje expresi řady genů, inhibuje růst nadzemní části, stimuluje opad listů, urychluje stárnutí.

Zvýšení koncentrace ABA indukované vodním stresem v listu, v apoplastu a ve svěracích buňkách (Zhang, S.Q., Outlaw, W.H., Jr. J. Plant growth regul. 20: 300, 2001)

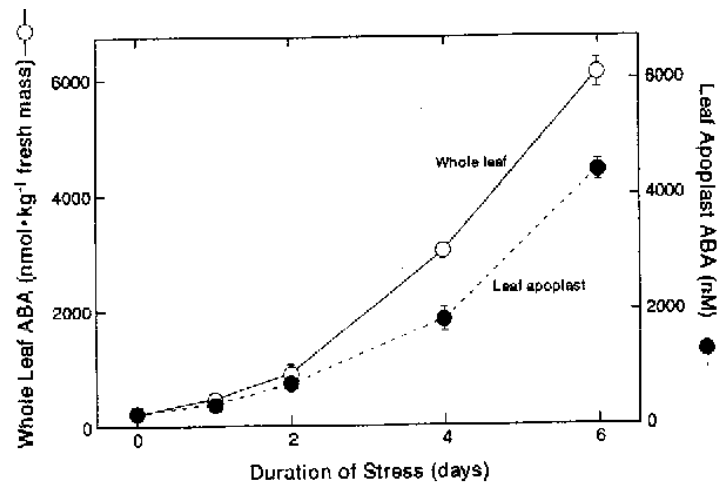


Figure 2. Effect of withholding of water on the ABA concentration in whole leaf (○) and in leaf apoplastic sap obtained by a pressure chamber (●). The analytical errors in the triplicate analyses of ABA for each sample were negligible. Other details are as in Figure 1.

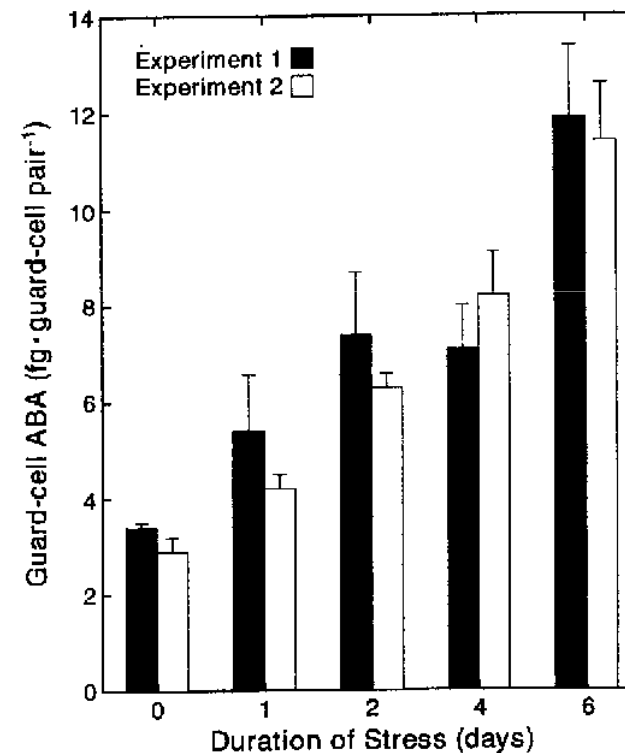


Figure 3. Effect of withholding of water on the ABA content of guard cells. The results of two experiments are shown; other data are in the text. Each column corresponds to one assay conducted in triplicate ($\bar{x} \pm SE$) on an extract of pooled guard cells.

Reakce průduchů na aplikaci ABA může záviset nejen na její koncentraci, druhu rostliny, ale také na pH

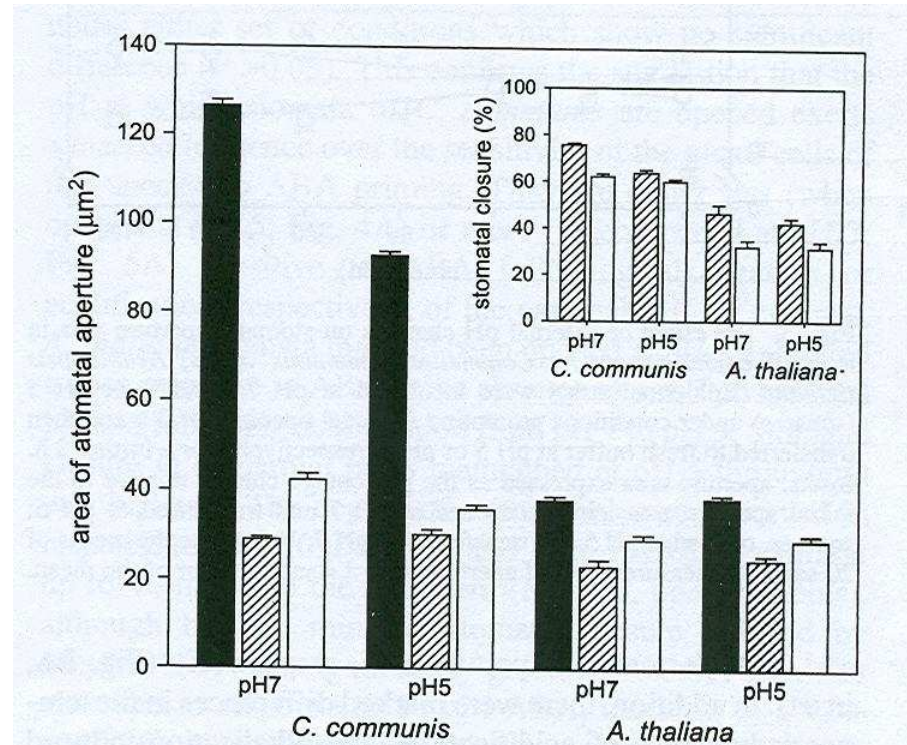


Fig. 2. Steady-state aperture areas of stomata in isolated epidermis of *Commelina communis* and *Arabidopsis thaliana* incubated at pH 7 or pH 5 under conditions promoting stomatal opening for 3 h (solid bars) and then incubated for a further 2 h in the presence of either 10 µM ABA (hatched bars) or 10 nM ABA (open bars). Inset: stomatal closure in response to either 10 µM ABA (hatched bars) or 10 nM ABA (open bars) expressed as the percentage change in aperture area relative to the initial aperture area. Values are the means of 150 separate measurements of aperture area \pm standard error of the mean.

ABA - mechanismus indukce zavírání průduchů

Receptory na vnější i vnitřní straně plazmalemy, může být rozdílné vazebné místo pro disociovanou (ABA^-) a nedisociovanou ABAH (možné receptory patří mezi G-proteiny: GCR2, GTG1, GTG2 nebo proteiny PYR/PYL/RCAR; Kim *et al.* 2010)

ABA ovlivňuje osmotický potenciál svěracích buněk

- inhibice kanálů pro transport K^+ dovnitř svěracích buněk (K^+_{in})
- stimulace kanálů pro transport K^+ ven ze svěracích buněk (K^+_{out})
- stimulace pomalých a rychlých kanálů pro transport aniontů ven ze svěracích buněk
- depolarizace plazmalemy

ABA působí změny mechanických vlastností svěracích buněk
struktura aktinových vláken a mikrotubulů

ABA působí změny v expresi genů

Ca²⁺ - sekundární posel

Změna koncentrace Ca²⁺ je obecným mezistupněm signálních drah vedoucích jak k zavírání tak k otevírání průduchů (je známo více než 200 proteinů které vážou Ca)

Ca²⁺ je transportován jak z apoplastu tak ze zásob ve vakuole speciálními kanály nebo pumpami

kanály pro transport Ca²⁺ jsou aktivovány:

- inositol-1,4,5-fosfátem, inositol hexakisfosfátem,
- cyklickou adenosin-difosforibózou (cADPR)
- G-proteiny

fosforylace a defosforylace proteinů , calmodulin

inhibice K⁺_{in}, stimulace K⁺_{out}, kanálů pro transport aniontů

změny v oscilacích koncentrace

Ca²⁺ může stimulovat i otevírání průduchů přes Ca-dependentní protein-kinázu která aktivuje tonoplastové kanály pro transport Cl⁻

Cesty působení ABA

Ovlivnění transportu K^+

1) Závislé na Ca^{2+}

ABA \Rightarrow fosfolipáza C \Rightarrow Ins3P \Rightarrow Ca^{2+} \Rightarrow inhibice K^+_{in} , aktivace K^+_{out}

ABA \Rightarrow ADP ribóza \Rightarrow Ca^{2+} \Rightarrow inhibice K^+_{in} , aktivace K^+_{out}

ABA \Rightarrow G-proteiny \Rightarrow Ca^{2+} \Rightarrow inhibice K^+_{in} , aktivace K^+_{out}

2) Nezávislé na Ca^{2+}

ABA \Rightarrow zvýšení pH cytoplasmy \Rightarrow inhibice K^+_{in} , aktivace K^+_{out}

ABA \Rightarrow inhibice H^+ -ATPázy \Rightarrow depolarizace membrány \Rightarrow inhibice K^+_{in} ,
aktivace K^+_{out}

Cesty působení ABA

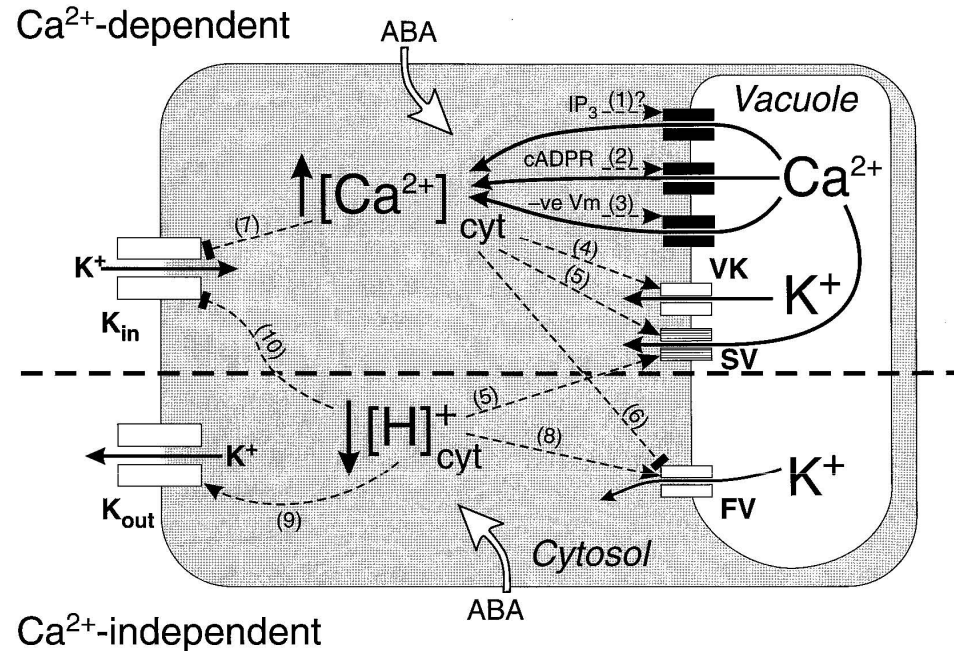


Fig. 11. Possible cation channel interactions during Ca^{2+} -dependent and -independent ABA induced guard cell turgor loss. ABA can initiate guard cell turgor loss through a rise in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, at least some of which appears to arise through mobilization of intracellular Ca^{2+} stores. Three possible pathways exist to mobilize Ca^{2+} from the vacuole. (1) Cytosolic inositol 1,4,5 trisphosphate (IP_3) can increase $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in guard cells (Gilroy *et al.*, 1990) although the IP_3 -gated channel has yet to be identified in guard cell vacuoles. (2) cADPR is able to activate Ca^{2+} -selective currents in guard cell vacuoles and elicit a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase (GJ Allen and C Leckie, unpublished data), and (3) hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels also exist in guard cells (Allen and Sanders, 1994). Although these channels are likely to be involved in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signalling their exact role in ABA-signalling is not fully understood. ABA-induced Ca^{2+} release from the vacuole does not preclude Ca^{2+} release from other internal stores, or influx across the plasma membrane. (4) An increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ will activate the vacuolar VK channel (Ward and Schroeder, 1994), initiating vacuolar K^+ release. Also the vacuolar SV channel (5) will be activated by $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, and in addition can be up-regulated by an increase in pH_{cyt} (Allen and Sanders, 1996; Schulz-Lessdorf and Hedrich, 1995). The activation of the SV channel could release additional Ca^{2+} and K^+ from the vacuole, increasing the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signal (Ward and Schroeder, 1994; Allen and Sanders, 1995). (6) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ will concurrently inhibit vacuolar FV channels and (7) plasma membrane K_{in} channels. In addition, the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -dependent activation of plasma membrane anion channels (not shown) will depolarize the membrane, thereby activating K_{out} channels. Alternatively, ABA may initiate guard cell turgor loss via Ca^{2+} -independent signalling which causes an increase in pH_{cyt} by as yet unknown processes. (8) The pH_{cyt} increase will be in the range where the FV channel will remain active, and so could be a pathway for vacuolar K^+ release (Figs 1, 3, 10). (9) ABA-induced pH_{cyt} increases would also activate the plasma membrane K_{out} channel (Blatt and Armstrong, 1993), and (10) could also inhibit the plasma membrane K_{in} channel (Grabov and Blatt, 1997).

ABA - regulace kanálů pro transport aniontů (Schroeder *et al.* 2001)

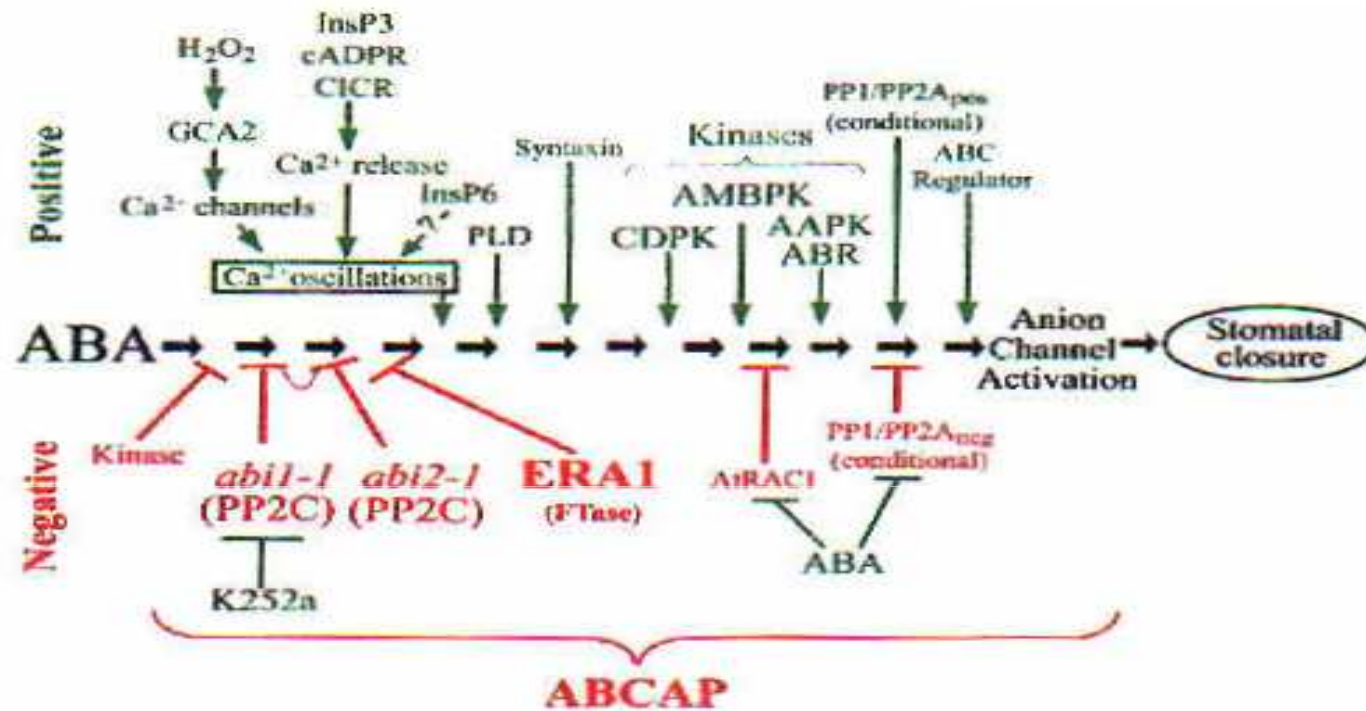


Figure 3 A working model for the proposed functions of positive and negative regulators of ABA-induced stomatal closing and of *S*-type anion channels in guard cells. Positive transducers are shown at top and/or in green and negative regulators are shown below in red. The sequence of events and epistasis among regulators remains largely unknown and requires further analysis. For simplicity, parallel signaling branches are not shown. Note that some of the ABA signaling “cassettes” (*top*, vertical cascades) may be activated by ABA in parallel (see text for details).

ABA - regulace kanálů pro transport K^+ _{out}

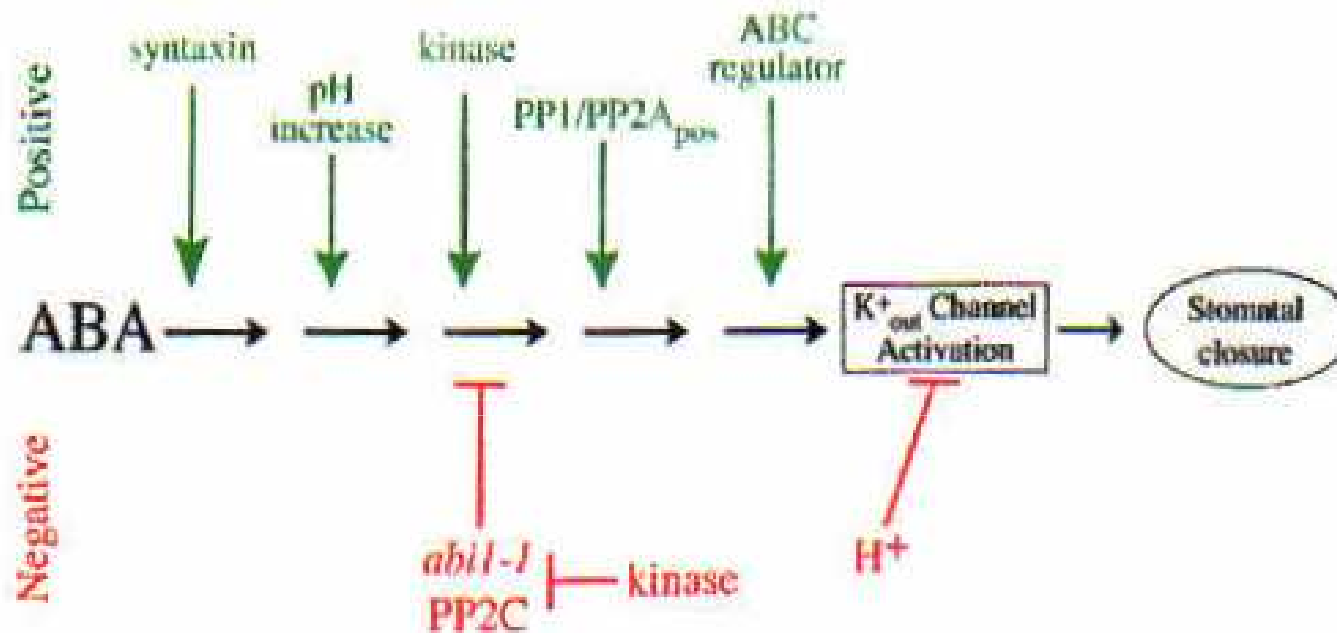


Figure 4 A working model for the proposed functions of positive transducers and negative regulators of K^+ _{out} channels in guard cells. Positive transducers (green, *top*) and negative regulators (red, *bottom*) are shown.

Vlhkost vzduchu

- snížení vlhkosti vzduchu → zvýšení peristomatální transpirace → snížení tlakového potenciálu svěřacích buněk → zavírání průduchů
- snížení vlhkosti vzduchu → zvýšení transpirace → snížení vodního potenciálu listů → zavírání průduchů
- snížení vlhkosti vzduchu → inhibice K_{in}^{+} a aktivace K_{out}^{+} → snížení osmotického potenciálu → zavírání průduchů (mechanismus ??, ABA??)

Koncentrace oxidu uhličitého

Průduchy reagují na CO_2 na světle i ve tmě, ale jejich citlivost je na světle vyšší; nízká konc. působí otevírání průduchů, vysoká koncentrace jejich zavírání; mechanismus není vyřešen, pravděpodobně spíše vliv vnitřní než vnější konc. CO_2 (možná i HCO_3^- , důležitá carbonic anhydráza)

Mechanismy:

- a) zvýšená c_i → snížená koncentrace zeaxantinu v chloroplastech (snížená reversibilní de-epoxidace violaxantinu přes anteraxantin na zeaxantin) → snížená aktivace ATPázy...
- b) zvýšená c_i → uvolňování malátu z buněk mezofylu do apoplastu - aktivace R-typu aniontových kanálů → zavírání průduchů
- c) zvýšená c_i → zvýšená tvorba malátu ve svěracích buňkách vedoucí k inhibici transportu H^+ a ke změně pH, depolarizaci membrán a stimulaci aniontových kanálů a K^+_{out}
- d) změna frekvence oscilací v obsahu Ca^{2+} , nízká konc. CO_2 - vyšší frekvence, počáteční fáze však nezávislá na Ca^{2+} , otevírání i zavírání průduchů

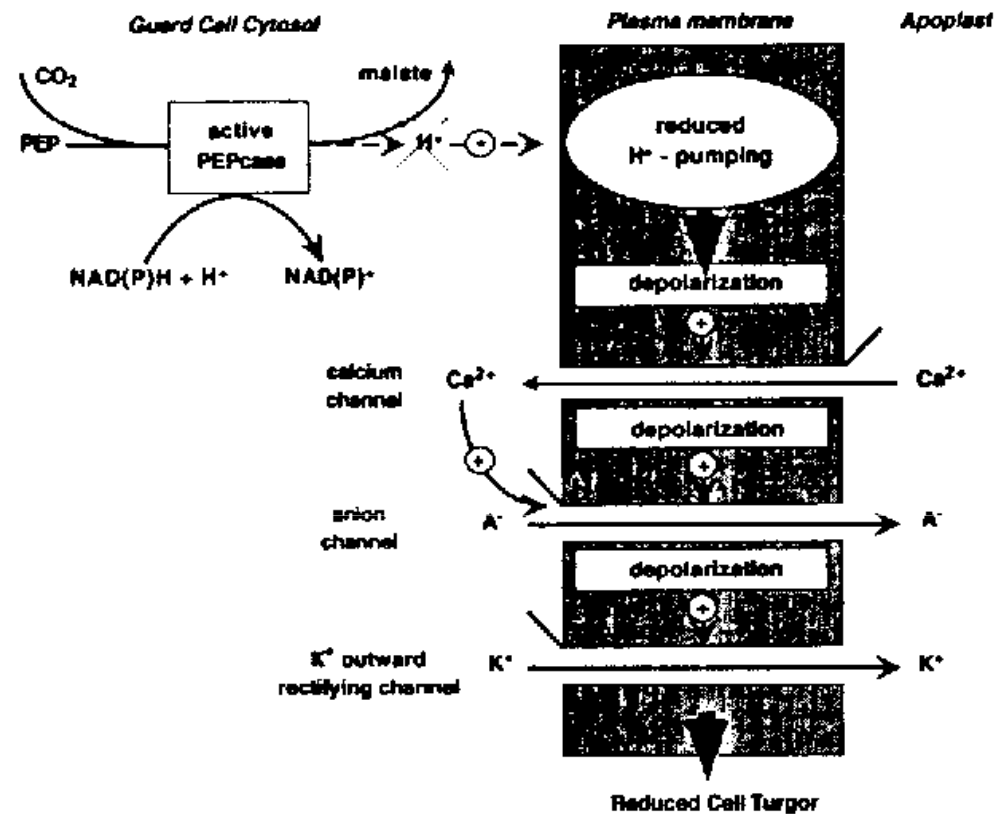


Figure 10. Scheme for the sensing and transducing processes implicated in the guard cell CO₂ response. A⁻, anion; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPcase, phosphoenolpyruvate carboxylase.

Ostatní fytohormony

- Auxiny - zvyšují nebo snižují g_s
- Cytokininy - zvyšují nebo nemění g_s
- Gibereliny - zvyšují nebo snižují g_s
- Jasmonáty - snižují g_s
- Brasinosteroidy - snižují g_s
- Etylén - ??

Mechanismy podobné jako ABA:

- ovlivnění Ca^{2+}
- aktivace nebo inhibice ATPázy
- cytokininy a auxiny snižují koncentraci NO
- *Interakce mezi ABA a jinými fytohormony*

Jiné faktory

- **Teplota** - 13 - 20 °C aktivace K^+_{in} a K^+_{out} ,
- 20 - 28 °C pouze K^+_{in} - proti přehřátí
- **Polutanty** SO_2 , NO_2 , O_3 - vysoké koncentrace obvykle zvyšují otevřenost průduchů, rychlost transpirace a tím zvyšují nebezpečí vodního stresu
- **Fusicocin** (fytotoxin produkovaný *Fusicoccum amygdali*) - otevírání průduchů aktivací protonové pumpy
- **H_2O_2 , NO, CO** - možné signální molekuly pro různé stresy
- $ABA \Rightarrow H_2O_2 \Rightarrow NO \Rightarrow G\text{-proteiny, ADP ribóza, Ins3P} \Rightarrow Ca^{2+} \Rightarrow \dots$

Působením ABA se fluorescence svěřacích buněk výrazně zvýšila, což indikovalo syntézu NO. K daleko menšímu zvýšení fluorescence docházelo při současném působení inhibitorů NO PTIO a zejména L-NAME.

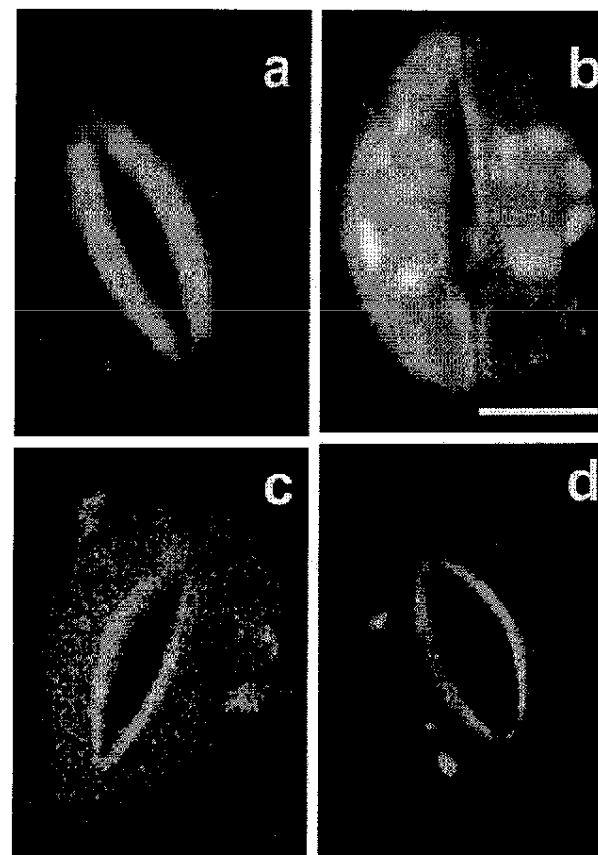
Obr. 2. Stržená epidermis byla inkubovaná v pufru MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) na světle 1 h, přidán DAF-2 DA (diaminofluorescein diacetate - používaný k vizualizaci syntézy NO) a po 30 min byla autofluorescence svěřacích buněk pozorována laserovým konfokálním skanovacím mikroskopem (Nikon PCM2000).

a - pouze MES

b - 10 μ M ABA

c - ABA + 200 μ M PTIO

d - ABA + 25 μ M L-NAME



Otevřenost průduchů u *Pisum sativum* na světle se výrazně snížila po aplikaci ABA nebo donorů NO (SNP - sodium nitroprusside, GSNO - S-nitrosoglutathione) .

Přidání inhibitorů NO (PTIO - 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide, L-NAME - a-nitro-L-arg-methyl-ester) zmírnilo reakci průduchů na ABA a zcela zvrátilo jejich reakci na NO (Neill *et al.* 2002)

A - 10 μ M ABA;

A+P - ABA + 200 μ M PTIO

A+L - ABA + 25 μ M L-NAME

S - 100 μ M SNP;

S+P - SNP + PTIO;

G - 500 μ M GSNO;

G+P - GSNO + PTIO

- Exogenní NO indukuje zavírání průduchů podobně jako ABA
- NO se tvoří ve svěracích buňkách při exogenním působení ABA
- Pro působení jak ABA tak NO jsou důležité cGMP a cADPR

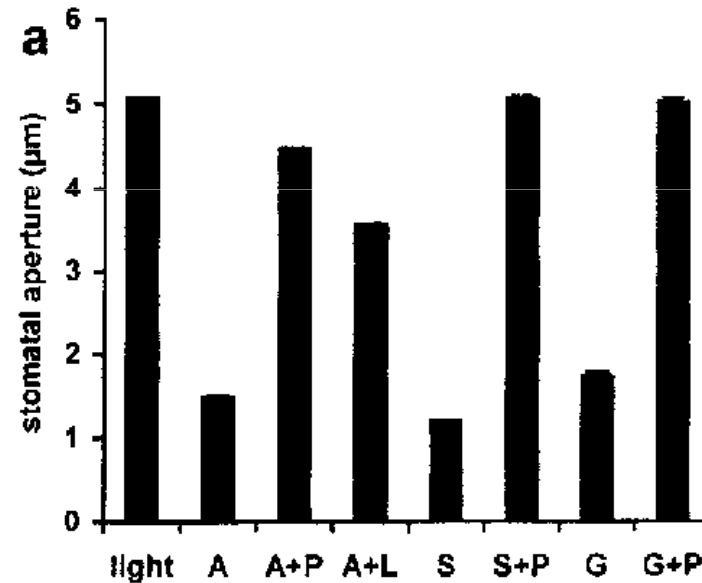


Schéma působení faktorů prostředí uvažující NO nebo H₂O₂ jako sekundární posli
(Desikan *et al.* 2004)

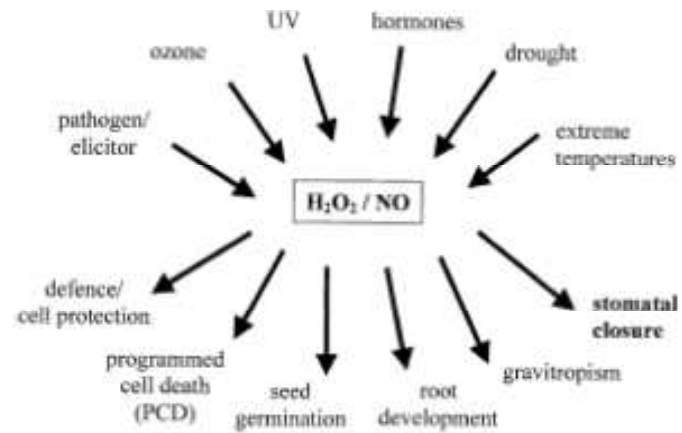


Fig. 1. Involvement of H₂O₂ and NO in cellular responses to various stresses and stimuli.