

6. Minerální prvky v rostlinách, jejich asimilace a funkce

Prvky, které tvoří živé organizmy, se nazývají **biogenní**. Vedle prvků (elementů), které **tvoří základ organických látek** – C, H a O, rostliny obsahují řadu dalších prvků, které se v přírodě vyskytují především **ve sloučeninách anorganických (minerálních, nerostných)** a označují se jako **prvky minerální**. Většina z těchto prvků plní v rostlině **specifické úlohy**, účastní se metabolických procesů nebo slouží k vytváření funkčních struktur. Takové minerální prvky, které jsou pro život všech druhů rostlin **nezbytné, nenahraditelné a ve svých funkcích jsou nezastupitelné**, se označují jako prvky **esenciální**. Rostliny bez jejich dostatku neprojdou všemi vývojovými stadii a ontogeneze končí předčasně. Dle svého **funkčně nezbytného obsahu v sušině** rostliny jsou prvky označovány jako makrobiogenní nebo mikrobiogenní (tab. 6-1.).

Makrobiogenní prvky – C, H, O, N, K, Ca, Mg, P, S – jsou v **1 kg sušiny** obsaženy

v množství **větším než 1000 mg** (1g).

Mikrobiogenní prvky – Cl, Fe, B, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo – jsou v **1 kg sušiny** zastoupeny

v množství **menším než 100 mg** (0,1 g).

Nedostatek esenciálních minerálních látek se projeví specifickými změnami tvaru nebo barvy orgánů, zasyčáním pletiv, zpomalením až zastavením růstu a poruchami vývoje. Projevy **deficience** (deficienční syndrom) jsou pro jednotlivé prvky značně charakteristické, různé rostliny však mají na množství jednotlivých prvků různé požadavky. **Nedostupnost kteréhokoli z esenciálních prvků je pro existenci rostliny limitující** – rostlina neprojde všemi fázemi ontogeneze a předčasně hyne.

Esenciální prvky mohou být v rostlině obsaženy v množství značně **vyšším**, než je pro aktuální stav rostliny nezbytně nutné. Některé prvky, zejména mikroelementy, mohou **ve vysokých koncentracích** v rostlině působit **toxicky**.

Vedle těchto prvků, které jsou nezbytné pro všechny rostliny obecně, mohou být některé prvky nezbytné jen pro některé rostliny, např. Si u přesliček (*Equisetum*), nebo jsou nezbytné jen za určitých podmínek. Takové prvky se nazývají **prospěšné** nebo **benefiční**. Patří mezi ně Si, Na, Co a Se, požadavky rostlin jsou v tomto ohledu velmi specifické. Rostliny mohou obsahovat i jiné prvky, než ty, které ke své existenci nezbytně potřebují (např. Rb, Au, Cd, Pb, V, Al, Co).

Rostliny získávají nezbytné minerální prvky z **okolního prostředí** a ve formě původní nebo asimilované je distribuují na funkční místa v rostlině. Klasicky se poznatky o potřebách minerálních prvků v rostlině označují jako **minerální výživa**.

Tab. 6-1. Obsah jednotlivých prvků v sušině (dle Salisbury F.B., Ross C.W.: Plant Physiology. - Waldsworth Inc., Belmont, California, 1992).

	chemická značka	forma dostupná rostlinám	obsah prvku v sušině (mg . kg ⁻¹)	relativní počet atomů ve srovnání s molybdenem
makrobiogenní prvky				
vodík	H	H₂O	60 000	60 000 000
uhlík	C	CO₂, HCO₃⁻	450 000	35 000 000
kyslík	O	O₂, H₂O	450 000	30 000 000
dusík	N	NO₃⁻, NH₄⁺	15 000	1 000 000
draslík	K	K⁺	10 000	250 000
vápník	Ca	Ca²⁺	5 000	125 000
hořčík	Mg	Mg²⁺	2 000	80 000
fosfor	P	H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻	2 000	60 000
síra	S	SO₄²⁻	1 000	30 000
mikrobiogenní prvky				
chlór	Cl	Cl⁻	100	3 000
železo	Fe	Fe²⁺, Fe³⁺	100	2 000
bór	B	H₃BO₃	20	2 000
mangan	Mn	Mn²⁺	50	1 000
zinek	Zn	Zn²⁺	20	300
měď	Cu	Cu⁺, Cu²⁺	6	100
nikl	Ni	Ni²⁺	0,1	2
molybden	Mo	MoO₄²⁻	0,1	1

■ Význam minerálních látek pro rostliny začal být předmětem hlubšího zájmu fyziologů v druhé polovině 19. stol. po té, co chemik J. von Liebig v r. 1840 publikoval své představy o minerální výživě rostlin.

Funkce a potřeba jednotlivých prvků se studuje nejčastěji pěstováním rostlin v živných roztocích známého složení, v nichž sledovaný prvek chybí od počátku nebo v určitém období kultivace. Pěstování rostlin v živných roztocích se nazývá **hydroponie**. Existuje několik obecně používaných živných roztoků přesně definovaného složení, např. roztok Hoaglandův nebo Knoppův. U rostlin pěstovaných v neúplných živných roztocích se sledují vybraná růstová kritéria a morfologické a vývojové změny. Mnohé cenné informace přineslo také pěstování rostlin v podmínkách *in vitro* (kap. 12.3.).

Příjem minerálních látek rostlinami, tj. **transport** těchto látek **z vnějšího prostředí do vnitřního prostředí rostlin**, znamená současně jejich **vstup do biosféry**. Rostliny jsou schopny přijímat minerální látky z okolního prostředí celým povrchem svého těla, naprostá většina minerálních látek je však přijímána **kořeny z půdy**. Schopnosti přijímat minerální

látky celým povrchem těla se využívá v zahradnické i agronomické praxi při tzv. hnojení na list. Zvětšováním kořenového systému – růstem kořenů do délky a tvorbou kořenů postranních – se zvětšuje oblast půdy, z níž mohou rostliny minerální látky čerpat. Nejvíce minerálních látek kořen přijímá v **zóně s kořenovými vlásky**, které výrazně zvětšují **kontaktní plochu povrchu kořene a půdy**.

Minerální **prvky** jsou přijímány **ve formě iontů – kationtů nebo aniontů**. V půdě jsou minerální látky rozpuštěné v **půdním roztoku**, s ním se v půdě pohybují **hromadným tokem**, v roztoku **difúzí**. Část kationtů je **adsorbována na negativně nabitý povrch půdních částic** (kap. 5.4.1.). Při dýchání buňky kořene vylučují CO_2 , který s vodou tvoří H_2CO_3 , disociující na H^+ a hydrogenuhličitanový anion (HCO_3^-). Kationty H^+ nahrazují kationty adsorbované na povrchu půdních částic (např. K^+ , NH_4^+) a uvolňují je do půdního roztoku, anionty HCO_3^- se na povrchu kořene vyměňují za anionty rozpuštěné v půdním roztoku a usnadňují jejich vstup do buněčné stěny.

Buněčná stěna je pro minerální látky prostupná, nepředstavuje významnou ani selektivní bariéru. Minerální látky se tímto prostředím pohybují především **difúzí**. Některé minerální prvky se v **buněčné stěně strukturně vážou**. Hlavní **bariéru vstupu minerálních látek do vnitřního prostředí rostliny tvoří plazmatická membrána**. Minerální prvky ji překonávají na povrchu kořene v **rhizodermis** nebo vstupují do apoplastu **primární kůry** a plazmalemu překonávají až v buňkách tohoto pletiva. Plazmalema **endodermis** s Casparyho proužky je bariérou nejzazší (viz. kap. 5.4.2.3.). Příjem minerálních látek je proces **aktivní**, značně **selektivní**, **řízený dostupností látky** v rhizosféře, aktuálními **potřebami** rostliny i jejími **schopnostmi látku asimilovat**.

V rostlině jsou minerální prvky transportovány v podobě, v níž byly přijaty, nebo přeměněné ve **formy transportní**. Na krátké vzdálenosti se pohybují **symplastem nebo apoplastem**, na dlouhé vzdálenosti z kořenů do prýtu **transpiračním tokem xylémovou částí cévních svazků**, tedy **apoplastem** (kap. 5.4.2.2.). Při **redistribuci** ze starších částí rostliny do částí mladších se minerální prvky v transportních formách pohybují **s proudem asimilátů lýkovou částí cévních svazků** (kap. 3.5.).

6.1. Transport minerálních látek přes membrány

Biologické membrány jsou **selektivně propustné bariéry**, tvořené lipidovou dvouvrstvou a integrálními a asociovanými proteiny. Přenos látek, které nejsou schopny spontánně překonat fosfolipidovou vrstvu, umožňují **specifické transportní membránové proteiny**.

▼ Fosfolipidová dvojvrstva a transportní membránové proteiny plazmalemy, tonoplastu, ostatních vnitřních membránových systémů a organel umožňují udržet často **velmi rozdílné množství iontů, vody a metabolitů** mezi apoplastem a symplastem i mezi jednotlivými kompartmenty protoplastů nebo buněčných organel (např. rozdílnou koncentraci H^+ v cytosolu, buněčné stěně a ve vakuole, K^+ v cytosolu a apoplastu nebo Ca^{2+} v cytosolu, vakuole, endoplazmatickém retikulu a v buněčné stěně). Transport minerálních látek přes membránu je **aktivní** nebo **pasivní** a uskutečňuje se různými mechanismy – aktivním transportem primárním nebo sekundárním, usnadněnou difúzí, výjimečně i prostou difúzí. Aktivní transport je závislý na dodání energie, je tedy spojen přímo nebo nepřímo s nějakou exergonickou reakcí, nejčastěji s hydrolyzou ATP. Pasivní transport probíhá bez dodání energie.

6.1.1. Elektrochemický potenciál

Hybná síla transportu určité látky **přes membránu** je dána **rozdílem jejího chemického potenciálu** na opačných stranách membrány (chemický potenciál viz též kap. 5.3.). Hodnota chemického potenciálu dané látky v sobě **integruje působení koncentrace** dané látky, **tlaku**, kterému je v daném prostředí vystavena, a **náboje** (pokud ho látka nese) na **množství volné energie** využitelné k práci, v tomto případě **k transportu látky přes membránu**. (V případě přenosu látek přes membránu je gravitační složka chemického potenciálu zanedbatelná.).

Minerální látky jsou přijímány jako ionty, vliv **náboje** v jejich případě hraje v hodnotě chemického potenciálu významnou roli a nelze ho zanedbat. Z těchto důvodů se pro ionty častěji užívá názvu **potenciál elektrochemický**, v němž je význam náboje zdůrazněn. Elektrochemický potenciál, obvykle značený μ , daného iontu (např. i) je dán následujícím vztahem:

$$\mu_i = \mu_i^0 + R \cdot T \cdot \ln C_i + P V_i + z_i \cdot F \cdot E$$

chemický potenciál iontu i	chemický potenciál iontu i za standardních podmínek	koncentrační složka iontu i	tlaková složka iontu i	složka elektrického potenciálu iontu i (vliv náboje)
---------------------------------	---	-------------------------------------	--------------------------------	--

μ_i – chemický potenciál iontu i , μ_i^0 – chemický potenciál iontu i za standardních podmínek, R – univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T – teplota v kelvinech, $\ln C_i$ – přirozený logaritmus koncentrace daného iontu, P – tlak (rozdíl mezi tlakem na iont v soustavě a tlakem atmosférickým, je dán hydrostatickým tlakem v buňce), V_i – parciální molální objem daného iontu, z_i – elektrostatický náboj iontu (+1 pro K^+ , -1 pro Cl^- , +2 pro Ca^{2+}), F – Faradayova konstanta ($96\,484 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$, $C = \text{coulomb}$), E – celkový elektrický potenciál prostředí ($V = \text{volt}$).

■ Kdybychom uvažovali o transportu iontu K^+ z cytosolu (C) do apoplastu (A) a předpokládali, že na obou stranách membrány je stejný tlak, mohli bychom vypočítat **hybnou sílu** $\Delta\mu_{K^+}$ ze vztahu:

$$\Delta\mu_{K^+} = \mu_{K^+}^C - \mu_{K^+}^A = R \cdot T \cdot \ln \frac{C_{K^+}^C}{C_{K^+}^A} + 1 \cdot F \cdot (E^C - E^A)$$

$\Delta\mu_{K^+}$ - hybná síla iontu K^+ , $\mu_{K^+}^A$ - elektrochemický potenciál K^+ v apoplastu, $\mu_{K^+}^C$ - elektrochemický potenciál K^+ v cytosolu, R – univerzální plynová konstanta, T – teplota v kelvinech, $C_{K^+}^A$ - koncentrace K^+ v apoplastu, $C_{K^+}^C$ - koncentrace K^+ v cytosolu, 1 – náboj K^+ , F – Faradayova konstanta, E^A – celkový elektrický potenciál apoplastu (V), E^C – celkový elektrický potenciál cytosolu (V).

Je-li hodnota **rozdílu elektrochemických potenciálů** $\Delta\mu_i$ pro daný ion (i) záporná, je možný jeho pasivní transport přes membránu. Je-li $\Delta\mu_i = 0$, je transport daného iontu přes membránu

v dynamické rovnováze, stejný počet iontů se přenáší oběma směry. Je-li hodnota $\Delta\mu_i$ kladná, je nutné transportu daného iontu energii dodat.

Rozdíl elektrických potenciálů na opačných stranách membrány může udržet transport určitého iontu (i) v dynamické rovnováze (stejný v obou směrech) i při značně rozdílných koncentracích daného iontu na opačných stranách membrány. Takový potenciál se nazývá **potenciál Nernstův** a lze ho vypočítat pomocí následujícího vzorce, který je odvozen ze vztahu předcházejícího:

$$E_{Ni} = E^C - E^A = \frac{RT}{z_i F} \cdot \ln \frac{C_i^C}{C_i^A}$$

E_{Ni} - Nernstův potenciál pro iont i, E^A – celkový elektrický potenciál na jedné straně membrány (např. v apoplastu), E^C – celkový elektrický potenciál na opačné straně membrány (např. v cytosolu), R – univerzální plynová konstanta, T – teplota v kelvinech, C_i^A - koncentrace iontu i na jedné straně membrány (např. v apoplastu), C_i^C - koncentrace iontu i na druhé straně membrány (např. v cytosolu), F – Faradayova konstanta, z_i – náboj iontu i.

Živé **biologické membrány oddělují prostředí s velmi rozdílnými elektrickými potenciály**. Rozdíl elektrických potenciálů na opačných stranách membrány se nazývá **potenciál membránový** a obvykle se značí V_m .

Membránový potenciál je výsledkem nevyváženosti počtu kladných a záporných nábojů na opačných stranách membrány, vzniká **komplexním působením** komponent membrány i obou prostředí, která jsou membránou oddělena. Membránový potenciál je ovlivněn také charakterem látek, které náboj nesou. **Negativní náboj** je na membránách **na straně cytosolu**. Na vzniku a udržování membránového potenciálu se **u rostlin nejvýznamněji** podílí **aktivní transport protonů z cytosolu**, působený transportními membránovými proteiny - **protonovými pumpami**, nazývanými též **H^+ ATPázy**. Potenciál působený **rozdílnou koncentrací protonů** na opačných stranách membrány se označuje jako **protonmotorická síla – pmf**. Hodnoty pmf u rostlin se udávají v rozmezí od -200 do -300 mV (obvykle se uvádí hodnota -268 mV). Aktivně jsou z cytosolu transportovány také **ionty Ca^{2+}** pumpami zvanými **Ca^{2+} ATPázy**. Činností H^+ ATPáz a Ca^{2+} ATPáz se membrána **hyperpolarizuje**, importem kationtů do cytosolu nebo exportem aniontů z cytosolu se hodnota membránového potenciálu zvyšuje (zmenší se jeho negativní hodnota) – membrána se **depolarizuje**.

▲ Další z příčin vzniku membránového potenciálu je skutečnost, že většina cytosolických proteinů při fyziologickém pH 7,5 na svém povrchu nese negativní náboj, který je vyrovnáván kladným nábojem K^+ . Membrána je pro cytosolické proteiny nepropustná, díky transportním proteinům však do jisté míry může propouštět ionty K^+ . Koncentrace K^+ v kompartmentech mimo cytosol je vždy nižší než v cytosolu a ionty K^+ mají tendenci z cytosolu unikat. Na straně cytosolu tak vzniká negativní náboj. Toto působení nepohyblivé proteinové složky s negativním nábojem a složky s pozitivním nábojem schopné překonávat membránu tvoří část membránového potenciálu, která se označuje jako **potenciál**

Donnanův. Další částí membránového potenciálu je **potenciál difúzní**, který vzniká různou rychlostí transportu aniontů a kationtů přes membránu (ionty K^+ opouštějí cytosol rychleji než ionty Cl^- , které mohou rozdíl náboje do jisté míry vyrovnávat).

Velikost (trans)membránového potenciálu V_m se vyjadřuje nejčastěji v jednotkách napětí v **mV** (nebo jako volná energie v $kJ \cdot mol^{-1}$). Membránový potenciál **plazmalemy u rostlin V_m** je asi **-150 mV**, pro **tonoplast** jsou uváděny hodnoty **od -20 mV do -90 mV** (hodnoty jsou méně negativní, tedy vyšší než na plazmalemě, rozdíl náboje mezi cytosolem a obsahem vakuoly je menší).

Rychlost transportu dané látky (iontu) přes membránu je dána nejen rozdílem jejího elektrochemického potenciálu ale také **propustností, tj. permeabilitou, membrány**. Permeabilita membrány je pro různé látky různá. Je dána **charakterem, počtem a aktivitou transportních proteinů**, které obsahuje. Permeabilita membrán je také **ovlivněna teplotou**.

6.1.2. Mechanizmy přenosu látek přes membránu

Podle **mechanismu přenosu** látek přes membránu se **transportní proteiny** charakterizují jako **pumpy, přenašeče** nebo **kanály** (obr. 6-1.). Jednotlivé minerální látky mohou být přes membránu přenášeny různými mechanismy, např. K^+ může být transportován kanálem nebo přenašečem, pro jeden ion může existovat více než typ přenašeče i kanálu.

6.1.2.1. Pumpy

Pumpy jsou transportní proteiny, které přenášejí iont, molekulu nebo komplex na opačnou stranu membrány ve směru gradientu jejich koncentrace, tj. ze strany membrány, kde je koncentrace daného iontu, molekuly, nebo komplexu nižší, na stranu membrány, kde je jejich koncentrace vyšší, za současného **přímého dodání energie**, která se **získává štěpením ATP nebo PPI** (u rostlin). Tento typ transportu se označuje jako **primární aktivní transport**. Zajišťují ho pumpy označované jako **H^+ ATPázy** typu P nebo V, **H^+ PPázy**, **Ca^{2+} ATPázy** a **ABC-transportéry** (kazety).

H^+ ATPázy jsou **pumpy přenášející H^+** z cytosolu do apoplastu nebo do vakuoly, tedy do míst, kde je koncentrace H^+ vyšší než v cytosolu. K transportu H^+ přes membránu **ve směru gradientu koncentrace protonů** využívají energii získanou štěpením ATP. Tímto **endergonickým přenosem protonů** se zvyšuje nejen rozdíl koncentrací protonů – **ΔpH** – na opačných stranách membrány ale také **rozdíl náboje** – zvyšuje se **protonmotorická síla** (pmf). Hodnota pH v cytosolu je obvykle 7,3 až 7,5, v apoplastu je pH asi 5,5, ve vakuole bývá pH ještě nižší. Tyto transportní proteiny tvoří nejen pmf ale současně také **udržují pH cytosolu**.

ATPázy přenášející H^+ **snížují hodnotu membránového potenciálu** (činí ho negativnějším, zvětšují rozdíl nábojů na opačných stranách membrány). Transport H^+ ATPázami je příkladem elektrogenního transportu. Jako **elektrogenní** se označuje transport, který **vede ke změně hodnoty membránového potenciálu**.

V plazmatické membráně jsou H^+ ATPázy, které se označují jako **typ P**. H^+ ATPázy typu P jsou tvořeny jedním polypeptidem o velikost asi 100 kDa, který má **10 hydrofobních oblastí**, jimiž je vázán v membráně (obr. 6-2.). N- i C-konec jsou v cytoplazmě. Protein váže H^+ a ATP. ATP se váže na aspartátový zbytek, který leží v cytosolu v delší hydrofilní smyčce mezi čtvrtou a pátou hydrofobní oblastí (hydrofobní oblasti jsou číslovány od N- konce). Vazebné místo pro H^+ je ve struktuře tvořené hydrofobními oblastmi 6 až 10. Protein H^+ ATPázy působí jako enzym, štěpí ATP tak, že **γ -fosfát** zůstane na protein **přechodně avšak kovalentně vázán**. Z této vazby fosfátu (P) na protein se odvozuje označení typu – typ P. Hydrolytické odštěpení γ -fosfátu poskytuje energii pro konformační změnu proteinu, která umožní přenos H^+ na druhou stranu membrány a jeho disociaci. Pro tuto hydrolýzu je funkčně významná hydrofilní oblast mezi druhou a třetí membránovou doménou. Energie uvolněná štěpením **jednoho ATP** umožní přenos **1 H^+** . H^+ ATPázy typu P jsou **aktivovány snížením pH v cytosolu** (optimální pH pro většinu H^+ ATPáz typu P je 6,6) nebo **fosforylací**. H^+ ATPázy typu P jsou inhibovány ortovanadátem. Této vlastnosti se využívá při studiu mechanismu jejich funkce.

▲C-konec proteinu H^+ ATPázy nese doménu, která interaguje s hydrofilními částmi proteinu v cytosolu a inhibuje funkci H^+ ATPázy. Tato **autoinhibice** je **odstraněna fosforylací serinového zbytku** v C-konci, která umožní **navázání regulačních proteinů**. Zatím bylo prokázáno působení proteinů ze skupiny, která se označuje jako **14-3-3** (označení je odvozeno z chování proteinů při frakcionaci na koloně a při elektroforéze). H^+ ATPáza je tímto procesem aktivována.

Proteiny H^+ ATPáz typu P jsou produkty malé rodiny genů (u *Arabidopsis* má asi 10 členů značených *AHA 1* až *AHA 10*), jednotlivé geny se exprimují specificky v různých typech pletiv.

V tonoplastu se vyskytuje **specifický typ H^+ ATPáz - typ V**, který strukturou poněkud připomíná ATP syntázy v thylakoidu nebo ve vnitřní membráně mitochondrie (obr. 6-3.). H^+ ATPázy typu V přenášejí do vakuoly **při hydrolýze 1 ATP 2 H^+** . Tento typ H^+ ATPáz má část V_0 , která je vázána v tonoplastu, a část V_1 , která ční do cytosolu, a váže a štěpí ATP. Obě části se skládají z většího počtu podjednotek.

H^+ PPázy představují další typ pump, které se vyskytují **v tonoplastu**, a **přenášejí H^+ do vakuoly**. K přenosu používají energii uvolněnou **štěpením anorganického pyrofosfátu (PPi)**. Jsou tvořeny jednoduchým proteinem o hmotnosti asi 80 kDa, který obsahuje **16 hydrofob-**

ních domén vázaných v tonoplastu. Tyto pumpy jsou **charakteristické pro rostliny** a vyskytují se v **mladých vyvíjejících se pletivech**, kde se PPi tvoří ve větším množství jako vedlejší produkt při syntéze UDP-glukózy pro tvorbu celulózy, při syntéze nukleových kyselin a proteinů. H⁺PPázy jsou inhibovány Ca²⁺.

Ca²⁺ATPázy jsou pumpy, které přenášejí **Ca²⁺ z cytosolu** do jiných kompartmentů, a energii k přenosu získávají podobně jako H⁺ATPázy typu P. Tyto transportní proteiny jsou lokalizovány v plazmatické membráně, v membráně endoplazmatického retikula, tonoplastu a ve vnitřní membráně chloroplastů. Jejich struktura je mimo konzervovaná funkční místa značně variabilní a charakteristická pro membránu, v které se daná Ca²⁺ATPáza vyskytuje. Na základě studia energetické bilance přenosu existuje představa, že pro transport 1 Ca²⁺ se využívá nejen **energie z přímé hydrolýzy ATP ale také protonmotorická síla** a že přenos Ca²⁺ z cytosolu je spojen s přenosem jednoho protonu opačným směrem. Ca²⁺ATPázy **udržují nízkou hladinu Ca²⁺ v cytosolu** a hrají významnou roli při **přenosu signálů** v některých signálních drahách. Ca²⁺ATPázy v plazmatické membráně, v tonoplastu a ve vnitřní membráně chloroplastu jsou **aktivovány kalmodulinem** a mají vyšší hmotnost proteinu. Doména pro vazbu kalmodulinu je u tonoplastové Ca²⁺ATPázy, na rozdíl od živočišných Ca²⁺ATPáz, na **N-konci** (obr. 6-4.).

ABC-transportéry (kazety) (z angl. *ATP binding cassette*) štěpí **ATP** a uvolněnou energii využívají **přímo** k transportu látek, které nejsou schopny překonat lipidovou dvouvrstvu, bez ohledu na jejich elektrochemický potenciál. Slouží především k transportu degradačních produktů, toxických metabolitů a cizorodých látek (např. herbicidů), často vázaných v komplexech (např. s glutationem; kap. 6.2.6) do vakuol. V poslední době byly tyto typy transportérů nalezeny také v plazmatické membráně a v mitochondriích. ABC-transportéry mají N-konec ve vakuole, C-konec v cytosolu, větší počet (např. 14) domén, jimiž jsou vázány v membráně a dvě vazebná místa pro nukleotidy.

6.1.2.2. Přenašeče

Přenašeče jsou integrální membránové proteiny, které na jedné straně membrány transportovanou látku navážou a na druhé straně membrány ji uvolní. Během přenosu dochází ke **konformačním změnám proteinu**, interakce s přenášenou látkou je však poměrně krátká, **přenášená látka není modifikovaná**. Transport přenašeči může být **aktivní nebo pasivní** a může být **saturován**.

▼ **Přenašeče** lze charakterizovat a hodnotit stejnými kritérii jako **enzymy**: **K_m enzymu** (konstanta Michaelise a Mentenové) je koncentrace substrátu, při níž se rychlost enzymatické reakce poloviční

než rychlost maximální možná. Vysoké hodnoty K_m charakterizují enzym s nízkou afinitou k substrátu. K_m přenašeče je koncentrace přenášené látky, při níž je rychlost jejího přenosu poloviční ($\frac{1}{2}V_{max}$) vzhledem k rychlosti nejvyšší možné (obr. 6-5.). Transportní proteiny, stejně jako enzymy, vykazují **specifitu k substrátu a snižují aktivační energii procesu** (v tomto případě přenosu iontu přes membránu). Transportní procesy jsou na rozdíl od enzymatických reakcí **prostorově orientované** (často se označují jako vektorové či vektoriální).

K aktivnímu přenosu látek přenašeči se využívá protonmotorická síla vytvořená H^+ ATPázami. Protony přenesené H^+ ATPázami z cytosolu se přes membránu pasivně vracejí do cytosolu ve směru svého koncentračního spádu a určité typy přenašečů mohou **tok protonů využívat k přenosu jiných iontů nebo molekul jiných látek** ze strany membrány s nižší koncentrací těchto látek na stranu, kde je jejich koncentrace vyšší (proti koncentračnímu spádu, tedy po směru jejich gradientu). Tento mechanismus přenosu se označuje jako **sekundární aktivní transport** (obr. 6-6.). Umožňuje využít protonmotorickou sílu k vytvoření nebo udržování velkého rozdílu koncentrace transportované látky mezi cytolem a apoplastem, mezi různými kompartmenty buňky nebo mezi kompartmenty buněčných organel. Přenašeče mohou přenášet anorganický iont nebo rozpuštěnou látku ve směru pohybu protonů nebo ve směru opačném. **Přenos látky stejným směrem jakým se pohybují protony se nazývá symport**, přenos **směrem opačným se nazývá antiport**. Protony se obvykle vracejí do cytosolu, symport tedy přenáší látky z apoplastu nebo z intracelulárních kompartmentů do cytosolu. Antiport slouží obvykle transportu látek (aniontů) z cytosolu. Přenašeče tohoto typu transportují přes membrány **anorganické ionty** (kationty i anionty) i některé **organické sloučeniny** jako je **sacharóza** (viz kap. 3.5.) nebo **aminokyseliny**. Rostliny mají **velké množství různých typů přenašečů, s různou mírou specifity a afinity k transportovaným látkám** (přenašeč K^+ přednostně transportuje K^+ , je však schopen přenášet také Rb^+ nebo Na^+ , nikoli však Cl^- nebo aminokyseliny; přenašeč neutrálních aminokyselin přenáší glycin, alanin a valin, nepřenáší však lysin nebo kyselinu asparagovou). Sekundární aktivní transport je pro příjem a distribuci minerálních látek velmi významný.

▲ Proteiny přenašečů tohoto typu mají velikost obvykle mezi 40 a 50 kDa a **12 výrazně hydrofobních** oblastí, jimiž je protein vázán v membráně. N- i C-konec jsou v cytosolu. Mezi šestou a sedmou hydrofobní oblastí (ve směru od N-konce) je hydrofilní smyčka, směřující do cytosolu. Transport látek pomocí přenašečů je regulován na úrovni transkripce genů kódujících příslušné proteiny i na úrovni posttranslačních úprav transportních proteinů.

Pasivnímu transportu látek přenašeči není nutno dodávat energii, látky jsou přenášeny ve směru koncentračního spádu. Tyto typy přenašečů vyměňují určitou látku za jinou a slouží k udržování optimálních koncentrací látek v určitých kompartmentech. Typickým příkladem je přenašeč TPT na vnitřní membráně chloroplastu, který transportuje fosforylované triózy

(dihydroxyacetonfosfát, DHAP) z chloroplastu do cytosolu výměnou za anorganický fosfát (Pi). Tento striktní antiport zamezí snížení hladiny fosfátu v chloroplastu. Podobně působí transportér na vnitřní membráně mitochondrie, který přenáší ADP do mitochondriální matrix výměnou za ATP.

Pasivní transport přenašeči nebo kanály se označuje také jako **usnadněná difúze**.

6.1.2.3. Kanály

Kanály jsou integrální membránové proteiny tvořící v membráně **póry**, které **usnadňují spontánní pasivní transport látek difúzí**. Rychlost a směr přenosu látek kanály závisí na rozdílu jejich elektrochemického potenciálu. Protonmotorická síla, tvořená pumpami, se k transportu iontovými kanály přímo nevyužívá, nicméně **pmf** se podílí na existenci membránového potenciálu a transport iontů iontovými kanály tak **nepřímo ovlivňuje**. Při přenosu **transportní protein nemění konformaci**, protein se s přenášenou látkou může ale nemusí přechodně vázat. Struktura a biofyzikální vlastnosti proteinu v oblasti vlastní transportní cesty, tj. póru, určují charakter přenášené látky, míra specifity je různá. Oblast póru, která je pro přenášenou látku určující, se nazývá selekční filtr. Kanály při přenosu iontů rozlišují kationty a anionty, kationtové kanály mají obecně vyšší míru specifity k přenášené látce než kanály aniontové. **Kanály se spontánně zavírají**, různé kanály **zůstávají otevřeny** různě dlouhou, vždy však **omezenou dobu**. Přenos látek je regulován aktivací (otevíráním) i inaktivací (zavíráním) transportní cesty.

▲ Kanály plazmatické membrány, které se velmi rychle otevírají a rychle se také zavírají, i přesto, že stimulus (např. změna napětí na membráně) ještě působí, se označují jako typ **R** (z angl. *rapid*), pokud se nacházejí v tonoplastu, označují se jako **FV** (z angl. *fast vacuolar*). Kanály, které zůstávají otevřeny po celou dobu působení stimulu se označují jako typ **S** (z angl. *slow*), pokud se nacházejí v tonoplastu jako **SV** (z angl. *slow vacuolar*).

Aktivace nebo inaktivace kanálů (angl. *gating*) jsou způsobeny konformačními změnami transportního proteinu. Konformační změny které mohou být vyvolány **změnou membránového potenciálu**, vazbou **ligandu** na protein, vlivy mechanickými – pnutím, tlakem nebo tahem, i působením více vlivů současně. Rostlinné membrány obsahují **velký počet různých typů kanálů**, které se liší nejen schopností přenášet určitou látku ale také způsobem aktivace. **Pro jednu látku** může existovat **několik typů kanálů s různým typem regulace**. Aktivace kanálů je významná pro udržení určitého prostředí v daném kompartmentu a má často charakter prahové odpovědi. Pokles membránového potenciálu pod určitou hranici aktivuje kationtové kanály (především pro K^+), které umožní vstup kationtů do cytosolu a zvýšení membránového potenciálu. Tyto kanály se označují jako **přítokové rektifikační kanály** (angl. *inward*

rectifiers). Jiné kanály se aktivují, stoupne-li membránový potenciál nad určitou hodnotu. Těmito otevřenými kanály kationty (K^+) opouštějí cytosol. Kanály aktivované zvýšením membránového potenciálu se nazývají **výtokové rektifikační kanály** (angl. *outward rectifiers*). Kanály **neurčují směr pohybu iontu**. Směr pohybu iontu je dán rozdílem elektrochemického potenciálu, přítokové a výtokové kanály jsou však aktivovány v různých situacích a různými stimuly.

■ Přenos iontů kanály a vlastnosti iontových kanálů se studují metodou zvanou záznam s pomocí terčíkového zámku (angl. *patch clamp method*). Metoda umožňuje měření velmi malých elektrických proudů, které vznikají při přechodu iontů kanály. Metoda je dnes na té úrovni, že lze sledovat děje i v jednom kanálu. Tenká skleněná kapilára o průměru ústí jeden nebo několik málo μm funguje jako mikroelektroda. Naplněna vodivým vodným roztokem se jemně přisaje na plazmatickou membránu nebo na tonoplast. V druhém konci elektrody je kovový vodič, proud přicházející iontovými kanály do mikroelektrody prochází připojeným vodičem a měřicími přístroji zpět do media, ve které je sledovaná buňka nebo pletivo. Elektrický proud (hodnoty 10 pA) je amplifikován a zaznamenáván. Hrubým sáním lze část membrány ohraničenou ústím elektrody oddělit a membránu přenést do definovaného a experimentálně modifikovatelného prostředí.

O **akvaporinech**, kanálech, které umožňují **transport vody** přes membránu, bylo pojednáno v kap. 5.4.2.1.

Pokud jsou kanály otevřeny, je **přenos velmi rychlý**. Proteiny iontových kanálů při transportu nemění konformaci a mohou přenášet **10^6 až 10^8 iontů za sekundu**. V proteinech pump a přenašečů dochází ke konformačním změnám a přenos je pomalejší. **Přenašeče transportují asi 1000 iontů nebo molekul za sekundu, pumpy asi 100 iontů za sekundu**.

Sledujeme-li příjem určité látky do cytosolu v závislosti na její koncentraci v prostředí, můžeme v úzkém rozsahu koncentrací shledat závislost lineární. V širším rozmezí koncentrací dané látky v prostředí dynamika příjmu většinou vykazuje dvě i více vln. Takový příjem se označuje jako **multifázový**. V případě multifázního příjmu můžeme předpokládat existenci **většího počtu transportních proteinů s různým mechanismem přenosu** pro danou látku nebo existenci **jednoho transportního proteinu s různou regulací afinity** k dané látce.

6.2. Makrobiogenní minerální prvky

6.2.1. Dusík

Dusík je čtvrtý nejčtenější prvek v živých organizmech.

V **atmosféře** dusík tvoří 78% objemu jako N_2 ($N\equiv N$), tato forma je však značně inertní a pro eukaryotické organizmy není využitelná přímo. Atmosféra obsahuje také množství **oxidů dusíku**, které se uvolňují při spalování fosilních paliv. V **zemské kůře** je dusík vázán v anorganických sloučeninách, jeho množství se odhaduje asi na 0,1% objemu. Objem zemské kůry je

však značný a absolutní množství dusíku v zemské kůře je velké, větší než v atmosféře. Ani v těchto formách však dusík není rostlinám přímo přístupný.

Biosféra obsahuje určité množství dusíku, který v různých formách koluje mezi živými organismy a jejich vnějším prostředím. **Pro přechod dusíku z prostředí do živých organismů mají rostliny naprosto zásadní význam.**

V půdě se dusík vyskytuje v mnoha sloučeninách **anorganických i organických**. Organické sloučeniny v půdě pocházejí z organismů odumřelých a z exkrementů nebo exudátů (např. kořenových) organismů živých. V půdě jsou činností půdních mikroorganismů organické sloučeniny dusíku měněny v různé látky anorganické. Některé z těchto látek jsou rostliny schopné přijímat (transportovat přes plazmalemu) a dusík v nich obsažený asimilovat. V organických sloučeninách rostlin je dusík zpřístupněn dalším organismům biosféry – živočichům i člověku.

Rozkladem organických látek, který působí půdní bakterie a houby, **vzniká amoniak NH_3** (angl. *ammonia*). Tomuto procesu se říká **amonifikace** (obr. 6-7.). Amoniak reaguje s vodou za vzniku NH_4^+ (angl. *ammonium*) a OH^- . Amonný kation může být **adsorbován** na negativně nabitě půdní částice a zadržován v půdních koloidech, **asimilován** půdními organismy a rostlinami do **aminokyselin** a z nich **odvozených metabolitů** nebo **oxidován** půdními mikroorganismy **na NO_2^- , NO_3^-** . Oxidace amoniaku na nitrit a nitrát se nazývá **nitrifikace**. Poskytuje energii pro existenci aerobním **půdním bakteriím**, např. rodu *Nitrosomonas*, které oxidují NH_3 na NO_2^- , a rodu *Nitrobacter*, které oxidují NO_2^- na NO_3^- .

Nitrátový anion NO_3^- může být **redukován** na NO_2^- , NO , N_2O nebo N_2 působením anaerobních půdních bakterií. Tyto procesy probíhají v hlubších vrstvách půdy a v půdách zaplavených nebo utužených, kde je obsah O_2 výrazně snížen. Souborně se tyto redukční procesy označují jako **denitrifikace**.

Některé bakterie (*Rhizobium*), vláknité aktinomycety (*Frankia*) a sinice (*Anabena*), jsou schopny **fixovat vzdušný N_2** . Činnost těchto organismů má **zásadní význam pro vstup atmosférického N_2 do biosféry**.

V **rostlinách** je dusík obsažen v mnoha **organických sloučeninách** různého charakteru – v **aminokyselinách, proteinech, bazích nukleových kyselin**, ve sloučeninách obsahujících **pyrolová jádra** (chlorofyly, cytochromy, chromofor fytochromů), v **kofaktorech** NAD(P)H , ve **fytohormonech** a dalších sekundárních metabolitech, např. v **alkaloidech**. Proteinové aminokyseliny tvoří proteiny s funkcí enzymatickou, strukturní nebo regulační, neproteinové aminokyseliny, jejichž počet je značně vyšší než počet aminokyselin proteinových, jsou výchozími metabolity pro syntézu dalších látek (např. kyselina 5-aminolevulová je substrátem

pro syntézu látek obsahujících pyrolové jádro). Určitá zásoba dusíku je udržována ve formě NO_3^- ve vakuolách.

Nedostatek dusíku v rostlině ovlivňuje řadu důležitých fyziologických pochodů včetně asimilace CO_2 , projevuje se inhibicí růstu i vývoje rostliny a chlorózou (nedostatek chlorofylu, tvorba světlých skvrn) především na starších listech a zvýšenou tvorbou antokyanů.

6.2.1.1. Příjem dusíku rostlinou

Rostlina **přijímá** dusík z půdy jako ionty NH_4^+ nebo NO_3^- nebo ve formě **aminokyselin**. Ve všech případech se jedná o **aktivní elektrogenní příjem**. Jen amoniak NH_3 může fosfolipidovou dvojvrstvou membrány difundovat. Rostlina v případě nedostatku N přijímá přednostně NH_4^+ (vysoce afinitní příjem NH_4^+ , který rostlina používá při nedostatku N, má vyšší kapacitu než vysoce afinitní příjem NO_3^-). V kyselých půdách je obsah NH_4^+ vyšší, neboť v nich nitrifikace probíhá pomaleji. Pro optimální vývoj rostliny je důležitý příjem N v obou formách.

Příjem NH_4^+ je zprostředkován **více než jedním typem přenašečů s různou afinitou k NH_4^+** a má nejméně **dvě kineticky různé složky**. Jeden z transportních proteinů u *Arabidopsis thaliana* byl identifikován a označen jako transportér AtAMT1 (z angl. *Arabidopsis thaliana ammonium transporter*). Jeho homology byly nalezeny i u jiných rostlin (např. rajčete) a u kvasinek. Protein AMT1 slouží současně také jako senzor NH_4^+ . Rodina genů AtAMT1 má nejméně tři členy. Všechny geny se exprimují současně především v kořenových vláscích, exprese jednotlivých genů je řízena různými faktory.

▲ Exprese genu *AtAMT1;1* je řízena **dostupností NH_4^+** . S klesající koncentrací NH_4^+ v prostředí exprese tohoto genu stoupá. Produkt genu *AtAMT1;1* má k substrátu **nejvyšší afinitu**, transportér je efektivní i při nanomolárních koncentracích NH_4^+ v prostředí. Gen *AtAMT1;2* je exprimován stále a jeho produkt efektivně transportuje NH_4^+ , je-li v prostředí přítomen v koncentracích **mikro- a milimolárních**. Exprese genu *AtAMT1;3* je naopak ovlivněna množstvím **látek, do nichž se NH_4^+ zabudovává**. Tento gen se exprimuje nejsilněji na konci světelné periody, kdy je do kořenů transportováno nejvíce asimilátů. Regulace exprese genu AtAMT1;3 zajišťuje optimální poměry mezi metabolismem N a C. Ve tmě mírně klesá také exprese genů AtAMT1;1 a AtAMT1;2. Tyto geny se také slabě exprimují v nadzemní části rostliny, především v dospělých listech, kde se NH_3 uvolňuje v mitochondriích při fotorespiraci (kap.3.3.1.).

V cytosolu je NH_4^+ rychle metabolizován. Je vázán na **kyselinu glutamovou** za vzniku **glutaminu**. NH_4^+ je toxický, ovlivňuje především funkci membrán (silně snižuje membránový potenciál).

Většina dusíku je rostlinou přijímána **ve formě nitrátového aniontu NO_3^-** . Anion NO_3^- je přijímán kořenovými vlásky, buňkami rhizodermis i buňkami primární kůry. Membrány těchto buněk mají **pro NO_3^- více typů přenašečů**, které mají různé vlastnosti a podléhají různým regulačním vlivům. Transport NO_3^- přes membrány je vždy **aktivní a elektrogenní**. Při pří-

jmu NO_3^- dochází k depolarizaci membrány, přestože NO_3^- nese negativní náboj. K příjmu NO_3^- se využívá **protonmotorická síla**, **1 anion NO_3^- je transportován symportem s 2H^+** . Proteiny přenášející NO_3^- přes membránu tvoří různé **transportní systémy**. Rostlina má pro příjem NO_3^- **vysoce afinitní transportní systémy** značené **HATS** (z angl. *high affinity transport system*) a **transportní systémy s nízkou afinitou**, značený **LATS** (z angl. *low affinity transport system*). Systémy jsou využívány podle dostupnosti NO_3^- v prostředí, aktuální potřeby dusíku i možnosti ho asimilovat.

▲ HATS má složku, která je exprimována stále i v nepřítomnosti NO_3^- v prostředí - cHATS (z angl. *constitutive*), a složku, která je indukována přítomností NO_3^- v prostředí v nízkých koncentracích – iHATS (z angl. *inductive*). Oba tyto systémy jsou satureovatelné. Indukovatelný HATS zahrnuje přenašeče kódované rodinou genů *NRT2* (z angl. *nitrate transporter*) a některé proteiny kódované rodinou genů *NRT1*. Proteiny kódované geny rodin *NRT2* a *NRT1* si **nejsou podobné**. Všechny geny *NRT2* jsou **indukovatelné přítomností NO_3^-** a **inhibované přítomností NH_4^+** a některých **aminokyselin v prostředí** a přítomností **glutaminu v cytosolu**. Umožňují upravit příjem NO_3^- podle možností prostředí i podle potřeby rostliny.

Při vyšších koncentracích NO_3^- v prostředí (nad 0,5mM) je využíván transportní systém LATS, tvoří ho transportní proteiny kódované rodinou genů *NRT1* a i tento systém má patrně složku indukovatelnou a konstitutivní.

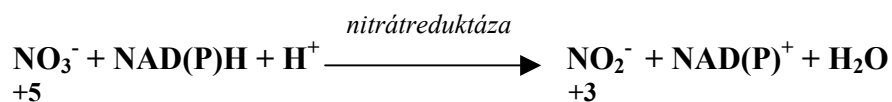
6.2.1.2. Redukce NO_3^-

Pro vstup dusíku do organických sloučenin (asimilaci) musí být **NO_3^- redukován na NH_3** . K redukci a asimilaci NO_3^- může docházet v buňkách kořene a do nadzemní části rostliny je N transportován v organických transportních formách nebo je do nadzemní části rostliny transportován nitrát a k jeho redukci a asimilaci dochází v listech. Různé druhy rostlin redukují a asimilují různě velké množství nitrátu v kořenech a transportují organicky vázaný dusík v různých sloučeninách (obr. 6-8.). Nitrát i jeho organické transportní formy jsou **z kořene do nadzemní části transportovány xylémem**, **z listů** je organicky vázaný N transportován do orgánů nadzemní části rostliny i do kořenů **floémem**. Nitrát může být **skladován ve vakuolách** buněk kořene, stonku i listů ve vysokých koncentracích (i více než 20 mM).

Některé druhy rostlin redukují převážnou část NO_3^- v kořeni (v buňkách povrchových vrstev primární kůry a při vyšších množstvích přijatého NO_3^- i v parenchymu centrálního válce, např. lupina), jiné druhy transportují NO_3^- do nadzemní části a redukují ho převážně ve fotosynteticky aktivních pletivech, především v mezofylu.

Redukce NO_3^- na NH_4^+ je značně **náročná na redukční sílu**. Mocenství N se mění z +5 na -3, k čemuž je třeba 8 elektronů. Redukce probíhá ve dvou fázích. V první fázi je **nitrát NO_3^- redukován na nitrit NO_2^-** . Reakce probíhá **v cytosolu** a je katalyzována enzymem **nitrátreduktázou** (NR). Druhá fáze – redukce NO_2^- na NH_3 probíhá **v plastidech** a je katalyzována enzymem **nitritreduktázou** (NiR).

Nitrátreduktáza je homodimer, každá podjednotka o velikosti asi 1000 aminokyselin váže tři kofaktory: **FAD** (flavinadenindinukleotid), **Fe vázaný v hemu** a **Mo vázaný s pterinem** (molybdenový kofaktor), které jsou nezbytné **pro přenos elektronů** (obr. 6-9.). **Donorem elektronů je NADH**, některé formy NR mohou využít i NADPH. Monomer má tři funkční části oddělené dvěma oblastmi regulačními. Na N-konci je funkční část (360 až 370 aminokyselin), která váže Mo-ko-faktor. Uprostřed je funkční část s Fe v hemové struktuře (75 až 80 aminokyselin). Mezi těmito dvěma částmi je regulační oblast I. Na C-konci je funkční část (asi 260 aminokyselinových zbytků), která váže FAD a je od střední části oddělena regulační oblastí II (obr. 6-9.). Na tuto část se váže NAD(P)H, předá 2 elektrony FAD, elektrony jsou transportovány přes atom Fe ve střední části proteinu na Mo-komplex, kde dojde k redukci navázaného NO_3^- .



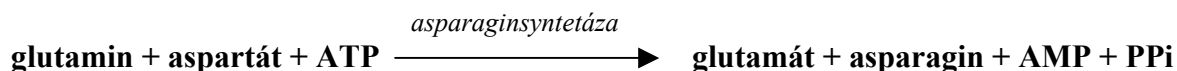
Nitrátreduktáza je **regulována řadou faktorů**, které působí na úrovni transkripce i posttranslačních úprav. Enzym je **aktivován** zvýšením hladiny NO_3^- , hladinou asimilátů (především sacharózy), CO_2 , světlem a cytokininy, **inaktivován** je asimiláty dusíku, např. glutaminem. Enzym je aktivní **jen v buňkách s funkčními plastidy**. Tento regulační faktor zajišťuje následující fázi redukce a brání hromadění NO_2^- , který je v podstatě toxický. Informaci o světle zprostředkuje fytochrom, jeho signál působí na úrovni transkripce genu pro NR. Transkripce genu *NR* podléhá také endogenní cirkadienní rytmicitě.

▲ Na posttranslační úrovni je enzym **inaktivován fosforylací** specifického serinového zbytku v regulační oblasti I, která umožní navázání regulačních proteinů 14-3-3. Fosforylaci katalyzuje specifická kináza, která je aktivována zvýšenou hladinou Ca^{2+} . Inhibice je reverzibilní, při jejím odstranění hrají roli specifické enzymy (kinázy), které uvolní proteiny 14-3-3, a fosfatáza, která odštěpí fosfát. Tato regulace působí **v obou směrech** a je velmi **rychlá**. Nitrátreduktáza inaktivovaná fosforylací a vazbou proteinů 14-3-3 je však rychleji degradována.

Druhá fáze redukce nitrátu – **redukce NO_2^- na NH_3 navazuje neprodleně na fázi první** a probíhá **v plastidech**. NH_3 reaguje s vodou a disociací produktu vzniká NH_4^+ . Pro druhou fázi redukce je třeba 6 elektronů, reakci katalyzuje **nitritreduktáza (NiR)**. Protein (60 až 70 kDa) je kódován v jádře, exprese genu je regulována na úrovni transkripce podobně jako gen pro NR. Protein nese na N-konci sekvenci, která ho určuje k transportu do plastidu a při transportu je odštěpena. Enzym má dvě funkční části a váže **dva kofaktory** (obr. 6-10.). Na N-konci se váže **donor elektronů, ferredoxin**. C-konec nese strukturu **4Fe-4S** a prostetickou skupinu, zvanou **sirohem**. Obě struktury jsou spolu propojené atomem S. Na tuto oblast se také váže NO_2^- .

Kyselina glutamová je významný metabolit, **proteinová** aminokyselina a také výchozí látka pro **syntézu pyrolového jádra** a všech látek, které tuto strukturu obsahují (např. chlorofyly, cytochromy, chromofor fytochromu).

Glutamin může poskytnout aminoskupinu také jiným látkám, jednou z nich je kyselina asparagová (aspartát). Touto cestou vzniká **asparagin**, další **důležitá transportní forma N**. Reakci katalyzuje asparaginsyntetáza (AS) a je nutné ji dodat energii štěpením ATP. Enzym je aktivován Cl^- .



Aspartát vzniká transaminací kyseliny oxaloctové, která je metabolitem Krebsova cyklu v mitochondriích (kap. 4.3.), v cytosolu vzniká karboxylací fosfoenolpyruvátu enzymem PEPkarboxylázou (kap. 4.3. a 3.3.2.). Pro metabolismus dusíku je významnější vznik oxalacetátu v cytosolu.

Asimilace dusíku ovlivňuje **metabolismus sacharidů** a **organických kyselin Krebsova cyklu** a jejich **transport mezi plastidy, cytosolem a mitochondriemi**. V plastidech se snižuje syntéza škrobu (snížením aktivity enzymu ADPglukózapyrofosforylázy) a zvyšuje se transport sacharidů do cytosolu. V cytosolu se zvyšuje aktivita **PEPkarboxylázy**, která katalyzuje tvorbu **oxaloctové kyseliny**. Oxaloctová kyselina je transportována do mitochondrií, kde je reakcemi Krebsova cyklu metabolizována na kyselinu **oxoglutarovou**. Aminací této kyseliny vzniká kyselina **glutamová**, na kterou je v plastidech vázán NH_4^+ vznikající redukcí nitritu.

Glutamát a glutamin jsou přímé nebo nepřímé zdroje dusíku pro syntézu všech ostatních rostlinných metabolitů obsahujících tento makroelement. Důležitá je **syntéza dalších proteinových i neproteinových aminokyselin**. Přenos aminoskupiny ($-NH_2$) katalyzují enzymy zvané **aminotransferázy**, běžněji užívaný název je **transaminázy**. Všechny tyto enzymy mají jako kofaktor pyridoxalfosfát (vitamin B₆). Aminotransferázy se vyskytují v cytosolu, plastidech, mitochondriích, glyoxizomech i peroxizomech. Transaminací **pyruvátu** vzniká **alanin**, z **glyoxalátu** **glycin**, z **hydroxypyruvátu** **serin**. Tyto aminokyseliny jsou výchozími substráty pro vznik všech heterocyklických struktur obsažených v dalších **aminokyselinách**, např. **prolinu**, **histidinu**, **fenylalaninu**, **tryptofanu**, i v látkách jiné povahy jako jsou **pyroly**, **puriny** a **pyrimidiny**.

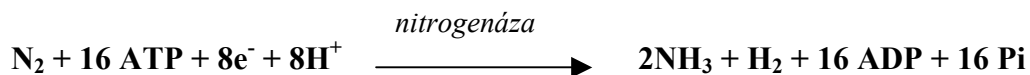
6.2.1.4. Fixace vzdušného dusíku

Fixace vzdušného N₂ významně ovlivňuje množství **dusíku v biosféře**. Fixovat vzdušný dusík jsou schopny **jen některé prokaryotické organizmy** - bakterie (*Azotobacter*, *Clostri-*

dium, *Klebsiella*), **aktinomycety** (*Frankia*) a **sinice** (*Anabena*, *Nostoc*), označované jako **diazotrofní**. Tyto organizmy žijí volně v půdě, některé sinice tropických pralesů žijí na povrchu listů. Základní způsob jejich existence je velmi různý - saprofytický aerobní (*Rhizobium*, *Azotobacter*) i anaerobní (*Clostridium*), u sinic fotoautotrofní. Při volné existenci fixuje N₂ pro vlastní potřebu jen několik málo druhů, např. bakterie *Azorhizobium* nebo vláknitá sinice *Nostoc*. Naprostá většina vzdušného dusíku je fixována při koordinovaném a vzájemně prospěšném **soužití** těchto **prokaryot s organizmy eukaryotními**, především s **vyššími rostlinami**. Soužití může mít formu **symbiomy** nebo **asociace**. Při symbióze může docházet k tvorbě specifických struktur – **hlízek**. Taková symbióza se nazývá **nodulující**. Symbióza, při níž se hlízky netvoří, se charakterizuje jako **nenodulující**. Hostitelské rostliny žijí v symbióze s diazotrofními prokaryoty především na stanovištích, kde je v půdě nedostatek NH₄⁺ a NO₃⁻.

Pro vstup N₂ do organických sloučenin je nutné nejprve **vzdušný dusík redukovat na NH₃**. **Redukci N₂ na NH₃** katalyzuje enzym **nitrogenáza**. Reakce je velmi **náročná na energii a redukční sílu**. energii a redukční sílu získávají prokaryotické organizmy z organických látek, které jim **poskytují hostitelské organizmy**. Hostitelský organizmus zajišťuje také okamžitý transport vznikajícího NH₃ z mikroorganismu do cytosolu vlastních buněk, neboť jeho zvýšená koncentrace vede k inhibici fixace N₂ a k poškození mikrosymbionta. Amonný iont je hostitelským organizmem neprodleně **asimilován** za vzniku kyseliny glutamové, glutaminu, asparaginu nebo dalších typů metabolitů. Při nodulujícím typu symbiomy hostitelský organizmus zajišťuje také **prostředí se sníženou koncentrací O₂**, neboť **nitrogenáza je ireverzibilně inaktivována kyslíkem**. Při nenodulujícím typu si takové prostředí vytváří mikroorganismus různými způsoby sám. Určité množství O₂ však aerobní mikroorganismy pro respiraci potřebují.

Redukci N₂ na NH₃ lze znázornit následujícím schématem:



▲ **Nitrogenáza** má současně hydrogenázovou aktivitu, při reakci jsou redukovány také 2 H⁺ na H₂. Vznikající H₂ se uvolňuje. Některé organizmy oxidují H₂ na H₂O, přičemž z ADP a Pi vzniká ATP.

Nitrogenáza je **komplexní protein**, složený ze dvou hlavních částí (obr. 6-11.). První část se nazývá dinitrogenázareduktáza, častěji se však označuje jako **Fe-protein**. Je složena ze dvou stejných proteinových podjednotek, které jsou propojeny **jedním komplexem 4Fe-4S**. Tato

část získává redukční sílu (e^-) od donorů a váže ATP. Druhá část nitrogenázy se nazývá dinitrogenáza, častěji se však označuje jako **MoFe-protein**. Je složena ze čtyř proteinových podjednotek, ze dvou podjednotek α a dvou podjednotek β ($\alpha_2\beta_2$). Obsahuje **dva integrální komplexy** tvořené atomy železa a síry **8Fe+7S** a další **dva komplexní kofaktory** tvořené molybdenem, železem a sírou - **1Mo+7Fe+6S**. Tato část katalyzuje vlastní redukci N_2 na NH_3 . U bakterií, které redukují N_2 i při volné existenci může být v komplexu místo Mo atom V nebo další atom Fe. Enzymy s těmito komplexy jsou však méně účinné.

Elektrony potřebné pro redukci N_2 poskytuje Fe proteinu **redukovaný ferredoxin** (protein se strukturou Fe-S) nebo **flavodoxin**. Flavodoxin je malý protein s prostetickou skupinou **FMN** (flavinmononukletid), některé bakterie ho tvoří při nedostatku Fe místo ferredoxinu, *Azotobacter* tvoří jen tento donor. Tyto bezprostřední donory e^- získávají elektrony z ketokyselin (pyruvátu, α -ketoglutarátu nebo dalších dikarboxylových kyselin – propojení s glykolýzou a Krebsovým cyklem).

Fe protein se redukuje a váže 2 ATP s dvěma atomy Mg^{2+} . Energie uvolněná při hydrolýze je využita k přenosu elektronu na MoFe protein a způsobí konformační změny, které oxidovanému Fe proteinu umožní přijmout další elektron z donoru, disociaci 2 (Mg)ADP a vazbu dalších 2 (Mg)ATP. K hydrolýze 2 (Mg)ATP jsou potřebné obě části enzymu – reduktáza i dinitrogenáza. Elektrony se na MoFe-proteinu akumulují nejprve na komplexech 8Fe-7S, pak se přemístí na komplexy MoFe, kde je vázán N_2 a $2H^+$, a dojde k redukci, při níž vznikají 2 molekuly NH_3 a jedna molekula H_2 .

V našem klimatu je nejčastější a **hospodářsky nejvýznamnější symbióza bakterií**, které se souhrnně označují jako **Rhizobia** (např. rody *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*), s druhy **rostlin čeledi bobovitých (Fabaceae)**. Jednotlivé druhy bakterií skupiny *Rhizobium* žijí v symbióze jen s omezeným počtem druhů hostitelských rostlin. Rostlina a bakterie tvoří narůžovělé struktury – **hlízky** neboli **noduly**. Proto se tyto bakterie často nazývají také **bakterie hlízkové**. Interakce bakterie a hostitelské rostliny začíná příjmem signálu a rozpoznáním partnerů. Následuje vstup bakterie do kořenového vlásku, vznik infekčního vlákna a transport bakterií do základu nodulu (obr. 6-12.). Základ nodulu začíná tvořit hostitelská rostlina dělením buněk primární kůry kořene jako reakci na signál z bakterie ve chvíli infekce kořenového vlásku. V dalších fázích se bakterie uvolní do buněk nodulu a vznikne **symbiozom**. V symbiozomu bakterie vytvoří specifickou formu existence, zvanou **bakteroid**, a začíná redukovat N_2 . Vznikající NH_4^+ je transportován do cytoplazmy buněk hostitelské rostliny a okamžitě asimilován, vzniká **asparagin, glutamin nebo kyselina glutamová**, které jsou **transportovány xylémem** do nadzemní části rostliny. U tro-

pických druhů čeledi *Fabaceae* (např. soja, podzemnice) se tvoří a z kořenů transportuje značné množství ureidů - **allantoinu** a **kyseliny allantoové**. V nadzemních částech rostliny, především v listech, jsou tyto metabolity katabolizovány na NH_4^+ , který vstupuje do anaboličských procesů přes **glutamát**. Transportní formy, **asparagin** a **glutamin**, jsou z listů distribuovány **floémem** u do ostatních částí rostliny (i do neinfikovaných pletiv kořene).

K symbióze dochází **na stanovištích chudých dusíkem**. Dodání amonných solí nebo dusičnanů do půdy má za následek snížení fixace N_2 , které se projeví snížením počtu vznikajících nodulů i intenzity fixace N_2 v nodulech již existujících. Množství fixovaného N_2 stoupá s **množstvím asimilátů transportovaných do kořenů** z nadzemní části, fixace N_2 je tedy pozitivně ovlivňována faktory, které zvyšují rychlost fotosyntézy, tj. světlem, optimální teplotou, dostatečným obsahem H_2O v půdě i ve vzduchu a množstvím dostupného CO_2 . Fixace N_2 je během dne nejvyšší v časném odpoledni, kdy je vysoký transport asimilátů z listů i vysoká transpirace, která zajišťuje transport látek z kořene. Během ontogeneze je fixace N_2 nejvyšší v období tvorby a ukládání zásobních látek v embryích (semena rostlin čeledi *Fabaceae* obsahují kolem 40% proteinů).

▲ Pro symbiózu je nutná exprese **specifických genů v rostlině i v bakterii**. **Rostlinné geny** potřebné k tvorbě hlízek se označují jako **nodulinové** (*Nod*), **bakteriální geny** nutné k symbióze se označují jako **nodulační** (*nod*).

Bakteriální geny nod kódují enzymy pro syntézu specifických látek, které se označují jako **faktory Nod**. Faktory Nod jsou glukosaminy nesoucí různé ligandy. U volně žijících bakterií se exprimuje pouze gen *nodD*, který je **regulační** a **epimuje se stále**. Geny *nodA*, *nodB* a *nodC* jsou geny obecné, vlastní všem symbiotickým druhům kmene *Rhizobium*. Kódují enzymy zajišťující syntézu základní **glukosaminové kostry faktorů Nod**. Na kostru tvořenou třemi až pěti acetylglukosaminy jsou vázány další **ligandy** – **mastné kyseliny** a další **sacharidy**. Ligandy určují více nebo méně specificky druh hostitelské rostliny a pro jejich syntézu jsou důležité produkty dalších genů, např. *nodE*, *nodF*, *nodP*, *nodQ*.

Rozpoznání bakterie a rostliny se děje v půdě. Rostlina uvolňuje z kořene do půdy látky, **flavonoidy** (luteolin, apigenin, daidzein, naringenin), **betainy** nebo **kyselinu aldonovou**, na které **bakterie reaguje kladnou chemotaxí**. Tyto látky se vážou na produkt genu *nodD*, který v tomto komplexu aktivuje další bakteriální geny *nod*.

Bakterie kontaktuje kořenový vlásek, který se zakříví a obklopí bakterii. **Morfologickým změnám** předchází depolarizace plazmatické membrány, způsobená importem H^+ a Ca^{2+} a změny v postavení aktinových filament. V místě buněčné stěny, které je v kontaktu s bakterií, dochází k hydrolýze buněčné stěny, plazmatická membrána se vchlipuje dovnitř buňky a tvoří tubulární strukturu, zvanou **infekční vlákno**. V infekčním vláknu se bakterie dělí. Látky, které tvoří membránu a obsah infekčního vlákna jsou produkovány hostitelskou rostlinou i bakteriemi. Současně s tvorbou infekčního vlákna se začínají dělit buňky v primární kůře a vytvářejí základ nodulu (hlízky), ke kterému infekční vlákno prorůstá a nese bakterie. Základ nodulu vzniká ve vnějších nebo vnitřních vrstvách primární kůry, především v blízkosti xylémových částí centrálního radiálního cévního svazku. Pokud základ nodulu vzniká v hlubších vrstvách, buňky primární kůry mění uspořádání cytoplazmy a připravují infekčnímu vláknu k základu nodulu cestu. Při styku s buňkou nodulu se membrána infekčního vlákna rozpouští, bakterie se uvolní a vstupuje do buněk obalena membránou odvozenou z plazmatické membrány buňky hostitelské rostliny. Proces připomíná endocytózu. Membrána obklopující bakterii se nazývá **peribakteriální membrána** (PBM), vzniká z plazmalemy buňky nodulu, obsahuje však také proteiny bakteriálního původu a má některé složky i vlastnosti tonoplastu. Struktura ohraničená touto membrá-

nou a obsahující jednu nebo více bakterií se nazývá **symbiozom**. Symbiozom se může zvětšovat, bakterie se v symbiozomu mohou ale nemusí dále dělit. V symbiozomu se bakterie mění na **bakteroid** – formu, která **fixuje N₂**. Membrána symbiozomu, obklopující bakteroid se musí přizpůsobit nové funkci. Mění se na **peribakteroidní**, zajišťující transport látek a signálů mezi bakterií a rostlinou. Ze symbiozomu do cytosolu hostitelské buňky je **transportován NH₄⁺**, v membráně je specifický a netypický typ **transportéru**, značený SAT1 (symbiosome ammonium transporter), s jednou transmembránovou doménou, **kódovaný hostitelskou rostlinou**. Z hostitelské buňky do symbiozomu jsou transportovány organické látky (především dikarboxylové kyseliny a pyruvát), H₂O (specifickým typem akvaporinů), i potřebné množství produktů asimilace NH₄⁺. Peribakteroid na straně cytosolu obsahuje **leghemoglobin**, protein s hemovou **prostetickou** skupinou, který řídí přístup O₂ k bakteroidu. Hem je syntetizován bakterií, protein hostitelskou buňkou.

Noduly jsou dvojího typu – **nedeterminované a determinované**. Oba typy nodulů mají v centrální oblasti infikované i neinfikované buňky. V **nedeterminovaném** neboli meristematickém typu nodulů se buňky v jeho apikální části dělí a infikují, v bazální části stárnou a odumírají. Tvoří je především druhy rostlin mírného pásma exportující **amidy**. V **determinovaném** typu nodulů dělení buněk ustává, hlízka se jako celek zakládá, vyvíjí, zraje, stárne a odumírá. Tento typ nodulů tvoří tropické druhy rostlin čeledi *Fabaceae*, exportující **amidy a ureidy**. Ureidy se tvoří v neinfikovaných buňkách nodulů z kyseliny močové, která se tvoří v hostitelských buňkách. Allantoin vzniká v peroxisomech, kyselina allantová je syntetizována v endoplazmatickém retikulu.

Nodulující typ symbiocy tvoří také *Frankia* s asi 60 druhy stromů a keřů (např. olše – *Alnus*, hlošina – *Eleagnus*, vřesna – *Myrica*, přesličník – *Casuarina*) z 9 různých avšak fylogeneticky blízkých čeledí. Shluky infikovaných buněk bývají obklopeny vrstvou neinfikovaných buněk s lignifikovanými buněčnými stěnami, které omezují přístup O₂. Tato symbióza je významná pro růst lesních ekosystémů, umožňuje šíření rostlin žijících v symbióze na stanoviště chudá dusíkem jako jsou např. močály (vřesna - *Myrica gale*) a písčné duny (přesličník – *Casuarina equisetifolia*). Asimilátem NH₄⁺ jsou **amidy a citrulin** (derivát kyseliny močové).

Nonodulující typ symbiocy tvoří **sinice** (*Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Phormidium*). Sinice většinou nevstupují do buněk a žijí v dutinách, které byly na hostitelské rostlině vytvořeny již před kontaktem se sinicí nebo je vznik dutin kontaktem se sinicí stimulován. Sinice v symbióze s fotosyntetizujícím hostitelem obvykle fotosyntetizovat přestávají a často si vytvářejí extracelulární pochvu, která jim umožní vytvořit prostředí se sníženou hladinou O₂.

Sinice Nostoc žije v symbióze s různými typy hostitelů - s houbou (*Peltigera* - lišejníky), mechorosty (např. *Blasia*, *Anthoceros*), cykasy (*Cycas*, *Dioon*), z krytosemenných rostlin *Nostoc* tvoří symbiózu pouze s vodní rostlinou *Gunnera* (intracelulární typ symbiocy). Pokud *Nostoc* žije volně v prostředí s nedostatkem NH₄⁺, tvoří pro fixaci vzdušného N₂ specializované silnostěnné buňky, zvané heterocysty. Fotosyntetický aparát v těchto buňkách postrádá fotosystém II, jehož činnost je spojena s produkcí O₂, a vytváří si tak prostředí s nízkou koncentrací O₂. Podobné buňky specializované pro fixaci N₂ tvoří i některé jiné volně žijící sinice (např. *Calothrix*). **Hospodářsky a produkčně významná** je symbióza **sinice Anabaena s kapradinou azola** (*Azolla*). Tato vodní kapradina je pěstována současně s rýží a spolu se symbiontem vý-

znamně obohacují rýžová pole dusíkem a umožňují tak stálé **pěstování rýže** na jednom stanovišti.

Asociativní soužití vzniká mezi bakteriemi *Azospirillum* nebo *Azotobacter*, které žijí na povrchu kořenů nebo v primární kůře kořenů trav, především typu C4. Tyto rostliny vylučují v kořenových exudátech zvýšené množství uhlíkatých sloučenin, které bakterie využívají jako zdroj energie. Prostředí se sníženou hladinou kyslíku si bakterie vytvářejí velmi intenzivní aerobní respirací.

Jen nepatrná část fixovaného a asimilovaného dusíku se dostává do půdy přímo v kořenových exudátech. Rostliny, žijící v symbióze s mikroorganizmem fixujícím N_2 , tvoří **bohatý kořenový systém i mohutnější nadzemní část** a množství dusíkatých metabolitů **ukládají**. **Činností půdních mikroorganismů** jsou dusíkaté látky z těl těchto rostlin (včetně hlízek) **postupně uvolňovány do půdy**. Tak se **dlouhodobě** zvyšuje obsah rostlinám dostupného dusíku i humusu v půdě. Vedle obohacení půdy dusíkem bohatý kořenový systém ovlivňuje strukturu půdy a její schopnost zadržovat vodu.

6.2.2. Draslík

Draslík je nejčetnější kation v rostlinách. Je přijímán z půdy ve formě K^+ a v rostlině se **neváže do stabilních sloučenin ani struktur**, tvoří jen slabé komplexy s organickými kyselinami, z nichž se snadno uvolňuje. K^+ se významně podílí na **udržování elektroneutality** buněk a spolu s doprovodnými anionty (Cl^- , malát²⁻) hraje důležitou úlohu v regulaci **osmotických poměrů buňky** a slouží k **udržování turgoru**. V cytosolu a v chloroplastech je koncentrace K^+ vysoká (80 až 200 mM) a v těchto kompartmentech je K^+ funkčně nezastupitelný jiným kladně jednomocným prvkem (Na^+). Ve vakuolách je koncentrace K^+ velmi různá, závisí na funkci a stavu buňky, obvykle se uvádí rozmezí 10 až 200 mM. Vakuoly svěřacích buněk při otevřeném průduchu mohou obsahovat K^+ v koncentraci až 500 mM. Změny obsahu K^+ vedou k reverzibilním **změnám objemu buněk při pohybech** orgánů (např. pozice listů působená objemem buněk tzv. polštářků, lat. *pulvini*) a otvírání a zavírání průduchů i k trvalým změnám objemu buňky při jejím **růstu**. Obsah K^+ v kořenu je významný pro **příjem vody a vznik kořenového vztlaku**. Při zvyšování osmotického potenciálu obsahu vakuoly může být K^+ do jisté míry zastoupen jinými kationty (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) nebo organickými látkami (sacharidy). Draslík ovlivňuje **hydrataci** a tím i **konformaci** proteinů, čímž mění **aktivitu enzymů**. Významný vliv K^+ byl prokázán u asi 50 enzymů, např. u škrobsyntázy.

V rostlině je draslík **velmi pohyblivý**, z kořenů do prýtu je K^+ transportován xylémem, ze starších částí rostliny do částí mladých floémem.

Deficience K^+ se projevuje především na starších částech rostliny. Nedostatek K^+ se nejprve projevuje **světlymi skvrnami**, které se objevují v apikální části listu, na jeho okrajích nebo jsou skvrny roztroušeny mezi žilnatinou. Později pletiva nekrotizují. Listy se mohou kroutit a nepravidelně prohýbat. Při deficienci K^+ jsou **stonky tenké** a slabé, **internodia zkrácena**. Rostliny, zejména obilniny, jsou náchylné k poléhání.

Příjem draslíku zajišťují **dva mechanismy, vysoko- a nízkoafinitní**. Nízkoafinitní mechanismus má také nižší specifitu k substrátu. V rostlině existuje **značný počet různých transportních proteinů**, které zajišťují příjem K^+ z půdního roztoku do rostliny, jeho import do xylému v kořeni a export z xylému v nadzemní části rostliny i transport mezi jednotlivými buněčnými kompartmenty.

Vysoce afinitní mechanismus zajišťuje příjem K^+ , je-li jeho koncentrace v prostředí nízká (μM). Příjem je elektrogenní, využívá protonmotorickou sílu a uskutečňuje se **symportem s H^+ v poměru 1:1**. Má složku konstitutivní a indukovatelnou. **Nízkoafinitní mechanismus** tvoří **přítokové rektifikační kanály**, které v buňkách přijímajících K^+ z půdního roztoku zůstávají dlouho otevřeny. Oba transportní mechanismy jsou tvořeny několika různými typy proteinů. Jak se ukazuje, jeden transportní protein může být funkční složkou obou mechanismů.

▲ Geny *AKT* kódují proteiny fungující jako přítokové rektifikační kanály. Mají 6 hydrofobních domén na N-konci (S1 až S6), na S4 je regulační oblast a mezi S5 a S6 je oblast tvořící pór a určující selektivitu přenosu. Na C-konci proteinu je oblast pro navázání nukleotidu a další regulační oblast. Gen *AKT1* je exprimován v rhizodermis a v buňkách primární kůry a je důležitý pro příjem K^+ z půdního roztoku, geny *AKT2* a *AKT3* jsou exprimovány v listech. Ukazuje se, že transportní protein AKT1 má dvojí charakter a je složkou vysoko i nízkoafinitního mechanismu.

Informace o proteinech transportujících K^+ , o jejich specifické funkci a mechanismech regulace jsou zatím neúplné a neumožňují pochopit komplexní regulaci hladin K^+ v určitých reakcích a stavech rostliny v plné šíři.

6.2.3. Vápník

Vápník je přijímán jako dvoumocný kation Ca^{2+} . Rostliny vyskytující se na půdách se zvýšeným obsahem Ca^{2+} se označují jako **vápnomilné** neboli **kalcifilní** (např. plesnivec horský – *Leontopodium alpinum*), rostliny **vápnobojné** neboli **kalcifobní** (např. metlice křivolaká – *Deschampsia flexuosa*) žijí na stanovištích s nízkým obsahem Ca^{2+} .

Do nadzemní části je transportován xylémem, jeho **redistribuce** ze starších do mladších částí rostliny je velmi **omezená**. Vápník prakticky **nevstupuje do floému**.

Nedostatek Ca^{2+} se projevuje především **na mladých částech rostliny** narušenou činností meristémů, tvorbou deformovaných listů a opadáváním tvořících se plodů.

V rostlině je vápník vázaný nebo volný. Ca^{2+} je schopen tvořit poměrně stabilní avšak reverzibilní **propojení makromolekul**, tzv. **vápníkové můstky**. Tato jeho vlastnost se významně uplatňuje **v buněčné stěně a střední lamele**, kde tvoří vápníkové můstky především mezi molekulami **pektinů**. Tyto vazby významně zvyšují pevnost buněčné stěny. Jako důležitý strukturní komponent buněčné stěny je Ca^{2+} nezbytný pro **zvětšování plochy buněčné stěny**, např. při růstu buňky, klíčení pylu a vzniku pylové láčky. Ca^{2+} ovlivňuje **soudržnost fosfolipidů v membránách** a jejich schopnost vázat proteiny.

V apoplastu jsou vedle kationtů Ca^{2+} **strukturně vázaných** v buněčné stěně a střední lamele další **ionty Ca^{2+} volné a pohyblivé**, které se vyměňují mezi vnějším **povrchem plazmatické membrány** a buněčnou stěnou. V apoplastu, zejména v mezibuněčných prostorech, lze najít také **Ca^{2+} v krystalech** šřavelanu, uhličitanu, fosfátu nebo sulfátu.

V cytosolu je koncentrace Ca^{2+} ve srovnání s apoplastem a jinými buněčnými kompartmenty udržována velmi **nízká** - asi **0,1 až 0,2 μM** (obr. 6-13.). V **buněčné stěně** je hladina Ca^{2+} asi **500 až 1000 μM** , v **endoplazmatickém retikulu** asi **10 μM** . Také v mitochondriích, chloroplastech a v jádře je obsah Ca^{2+} vyšší než v cytosolu. Ve **vakuole**, kde je koncentrace Ca^{2+} **100 až 1000 μM** , může dojít k tvorbě **krystalů** s anionty organických i anorganických kyselin. Udržování nízké hladiny Ca^{2+} v cytosolu je důležité mimo jiné také proto, aby nevznikaly nerozpustné vápenaté fosfáty, které by snižovaly hladinu metabolicky dostupného Pi.

Nízká hladina Ca^{2+} v cytosolu je udržována aktivně činností Ca^{2+} ATPáz. Ca^{2+} ATPázy přenášejí Ca^{2+} z cytosolu **do kompartmentů**, kde je **elektrochemický potenciál Ca^{2+} vyšší**. **Proti transportu Ca^{2+} z cytosolu** působí nejen značný rozdíl **koncentrace** ale i **dva přenášené kladné náboje**. K transportu Ca^{2+} z cytosolu je využívána energie z přímé hydrolýzy ATP i protonmotorická síla (kap. 6.1.2.1.).

Vstup Ca^{2+} do cytosolu umožňují **kanály**. Kanály jsou schopny transportovat 10^6 iontů za sekundu. **Změna koncentrace Ca^{2+} je tedy velmi rychlá**, obzvláště v oblastech kolem ústí kanálů do cytosolu, neboť **difúze Ca^{2+} cytoplazmou** je značně **pomalá** (difúze Ca^{2+} v cytosolu byla sledována pomocí izotopu ^{45}Ca). To umožňuje vytváření gradientů Ca^{2+} v buňce. Rostlinné buňky obsahují **značné množství různých typů kanálů**. Jednotlivé typy kanálů se vyskytují v určitém typu membrán, nemusí být v membráně rozmístěny homogenně, jsou řízeny různými signály a liší se kinetikou otevírání a zavírání. Kanály plazmatické membrány, jimiž vstupuje Ca^{2+} do cytosolu z apoplastu, jsou aktivovány určitými hodnotami **membránového potenciálu** (angl. *voltage gated channels*) nebo **mechanickými podněty** (pnutí, tah, tlak, an-

gl. *stretch*). Mechanické podněty může způsobit např. změna turgoru (osmotický stres), teplotní šok, vítr nebo dotek pevného předmětu. Kanály, které umožňují vstup Ca^{2+} do cytosolu z vakuoly, ER nebo jádra jsou aktivovány membránovým potenciálem a **vazbou ligandů**. Ligandy jsou zatím známy dva – **IP_3** (inozitoltrifosfát) a **cADPR** (cyklická adenosin-5'-difosforibóza). V tonoplastu se vyskytují kanály regulované všemi třemi typy podnětů.

V cytosolu se Ca^{2+} váže **reverzibilně, přímo nebo v komplexu s kalmodulinem** na některé **proteiny**, jejichž funkce je tím významně ovlivněna. Odhaduje se, že rostlinné buňky obsahují několik set různých proteinů, jejichž aktivita je vazbou Ca^{2+} nebo komplexem Ca^{2+} s kalmodulinem ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) řízena.

▼ **Kalmoduliny** jsou **malé regulační proteiny** (15 až 17 kDa) přítomné prakticky ve všech pletivech, nejvyšší hladiny kalmodulinů jsou v meristémích. V buňkách jsou kalmoduliny volné (v cytosolu, v jádře) nebo vázané na plazmatickou membránu. Kalmoduliny mají na N- i C-konci globulární struktury oddělené střední částí tvořenou α -šroubovicí. Na každé globulární části jsou dvě vazebná místa pro Ca^{2+} (obr. 6-14.). Kalmoduliny **vazbou čtyř Ca^{2+} mění terciární strukturu** a získávají schopnost vázat se na proteiny.

Komplexy kalmodulinu s Ca^{2+} se nejčastěji vážou **na proteinové kinázy nebo fosfatázy**, jejichž enzymatickou aktivitu mění. Vážou se však také na některé **transkripční faktory** a **proteiny cytoskeletu** (např. na mikrotubuly při organizaci dělicího vřeténka), na proteiny tvořící **kanály pro K^+** ve svěracích buňkách průduchů nebo na **Ca^{2+} ATPázy** plazmatické membrány a tonoplastu.

U vyšších i nižších **rostlin** je množství **proteinových kináz aktivováno pouze vazbou Ca^{2+}** . N-konec těchto enzymů nese oblast s kinázovou aktivitou. Na C-konci mají tyto kinázy strukturu podobnou kalmodulinu, která se váže na N-konec a působí **autoinhibici** kinázové aktivity. Po navázání Ca^{2+} se autoinhibice zruší. Tyto kinázy mohou být volné v cytosolu, vázané na membrány nebo na chromatin. Ca^{2+} působí např. aktivaci kináz, které fosforylují H^+ ATPázy. Kinázy mohou fosforylovat a tím aktivovat nebo inaktivovat transkripční faktory (v místech, kde probíhá aktivní transkripce, je množství chromatinových proteinů fosforylováno).

Změna koncentrace Ca^{2+} v cytosolu vyvolává metabolické změny, které jsou součástí **přenosu různých signálů** (kap. 8.2.5.2.; kap. 12.1.4.). V těchto procesech vápník funguje jako tzv. **druhý posel**. Signál vyvolá otevření kanálu pro Ca^{2+} a jeho hladina v cytosolu rychle stoupne. Ca^{2+} sám nebo v komplexu s kalmodulinem vyvolá určité funkční změny proteinů a navodí další příslušné procesy a reakce, mezi nimi také aktivaci Ca^{2+} ATPáz na plazmatické membráně, tonoplastu a ER, které nízkou hladinu Ca^{2+} v cytosolu obnoví (kap. 6.1.2.1.). Vedle Ca^{2+} ATPáz jsou aktivovány také některé H^+ ATPázy.

6.2.4. Hořčík

Hořčík je malý dvoumocný kation. V podobě Mg^{2+} je přijímán a distribuován po rostlině. Z kořenů do nadzemní části je transportován xylémem, ze starších částí rostlin do mladších částí je **redistribuován** floémem. Příjem Mg^{2+} je inhibován přítomností dalších kationtů, především K^+ , NH_4^+ a Ca^{2+} v půdním roztoku. V semenech je hořčík obsažen především jako **hořečnatá sůl kyseliny fytové** (viz kap. 6.2.5.).

Mg^{2+} tvoří iontové a kovalentní vazby s dalšími molekulami. Tyto vazby, tzv. hořčíkové můstky, zajišťují správné **prostorové uspořádání komponent ve funkčních strukturách stabilních i dynamických** (např. při enzymatických reakcích). **Strukturně je Mg^{2+} vázán v chlorofylu** a hraje důležitou úlohu při interakci pigmentu se strukturními proteiny anténních komplexů. Zajišťuje **soudržnost podjednotek v ribosomech** a je tedy nezbytný pro syntézu proteinů.

V primární fázi fotosyntézy, kdy jsou protony přenášeny ze stromatu do lumenu, je Mg^{2+} z lumenu uvolňován do stromatu, kde **kompensuje úbytek kladných nábojů** a současně **aktivuje některé enzymy Calvinova cyklu**, např. **Rubisco** a fruktóza-1,6-bisfosfátfosfatázu. Mg^{2+} pozitivně ovlivňuje **aktivitu RNA polymeráz** a mnoha dalších **enzymů**. **Dynamicky interaguje** s fosfátovými skupinami **ATP** a umožňuje průběh některých enzymatických reakcí, např. syntézu glutaminu (katalýza glutaminsyntetázou) při asimilaci NH_4^+ (kap. 6.2.1.3.), u prokaryotických mikrosymbiontů redukci N_2 nitrogenázou při fixaci vzdušného dusíku (kap. 6.2.1.4).

Nedostatek Mg^{2+} se projevuje vznikem **chlorotických skvrn** na listech mezi žilnatinou na starších listech a inhibicí růstu a vývoje v důsledku snížené schopnosti syntetizovat proteiny a RNA.

6.2.5. Fosfor

Fosfor je přijímán z půdy ve formě **fosfátového aniontu $H_2PO_4^-$** ,
$$\begin{array}{c} O^- \\ | \\ OH-P-OH \\ || \\ O \end{array}$$
. Anorganický fosfát v rostlině je obvykle označován **Pi**. Fosfátový anion je ve vodě poměrně málo rozpustný a v půdě je silně vázán na ionty Fe a Al, které jsou adsorbovány na negativně nabitým povrchu půdní částic. V půdním roztoku je koncentrace Pi asi **1 μM** i **nižší** a Pi je z rhizosféry záhy vyčerpán. Obsah fosfátu dostupného v půdě se snižuje také tím, že půdní organizmy vážou Pi do **organických látek**, které **nejsou rostlinami využitelné**.

Nedostatek Pi se projevuje **zakrslostí**, tmavě zelenými listy, které mohou mít abnormální tvar (malformace listů), nekrotické skvrny a brzy opadávají. Podobně jako u nedostatku dusíku, se zvyšuje tvorba antokyanů (zvýšená tvorba antokyanů je nespecifický projev stresu).

Dostupnost Pi pro rostlinu velmi významně **zvyšuje endomykorhiza** (vesikulárně arbuskulární). Hustou spleť hyf houba získává Pi z podstatně **většího objemu půdy** (kap. 5.4.1.) než je rhizosféra. Rostliny získávají Pi z povrchu arbuskulů a aktivně ho transportují přes plazmalemu do cytosolu buněk primární kůry kořenů. Rostliny poskytují houbě organické látky k existenci a růstu.

▲ Potřeba Pi u rostlin je značná a proto rostliny, které nežijí v mykorhize, vyvinuly k jeho získání z půdy řadu různých mechanismů. Některé rostliny, např. lupina – *Lupinus albus*, na nedostatek Pi reagují tvorbou velmi **členitého a hustého kořenového systému** včetně tvorby terciárních postranních kořenů (takový kořenový systém se označuje jako proteoidní). Kořeny vylučují do rhizosféry organické kyseliny, zejména **kyselinu jablečnou a citrónovou**, které vážou Fe a Al do **organických komplexů**, a uvolňují Pi z vazby v půdních koloidech. Pi je transportován přes plazmalemu do buněk rhizodermis. Kyseliny vylučované z kořene jsou odvozeny z fosfo-*enol*-pyruvátu (PEPkarboxyláza – kap. 4.3.) a jejich tvorba a exudace představuje pro rostlinu značnou energetickou zátěž.

Další strategií, kterou rostliny pro získávání Pi vyvinuly, je **vylučování kyselých fosfatáz** do rhizosféry. Tyto enzymy odštěpují fosfát z organických sloučenin v půdě a uvolňují ho pro příjem do rostliny.

Příjem fosfátu je aktivní, fosfátový anion je přenášen z půdního roztoku **do cytosolu**, kde je jeho koncentrace 5 až 10 mM, tj. **o 3 a více řádů vyšší než v půdním roztoku**. Proti příjmu Pi z půdního roztoku do cytosolu působí nejen značný **rozdíl koncentrací** ale i jeho **záporný náboj**. Příjem Pi do rostliny zajišťuje **přenašeč s vysokou afinitou k substrátu**, který k transportu přes plazmalemu využívá **protonmotorickou sílu**. Transportní proteiny byly zatím identifikovány dva, PT1 a PT2 (z angl. *phosphate transporter*). **Transkripce** příslušných genů se při **nedostatku Pi** dramaticky **zvyšuje**. Exprese genů *PT1* a *PT2* je naopak silně snížena po kontaktu rostliny s **mykorhizní houbou** a po vytvoření mycelia. Transportní proteiny PT1 a PT2 jsou si velmi podobné, mají šest hydrofobních membránových domén na N-konci a šest domén stejného charakteru na C-konci, které jsou odděleny dlouhou hydrofilní oblastí (struktura se označuje jako SLS, z angl. *six – loop – six*; obr. 6-15.). Na této oblasti je místo pro navázání fosfátu (podobnou strukturu mají také transportéry sacharózy a aminokyselin). Transportní proteiny pro Pi se vyskytují **především v rhizodermis**. Příjem Pi je řízen jeho **hladinou v cytosolu**, přenašeč je inaktivován fosforylací na straně cytosolu.

Fosfát může v rostlině existovat jako **anorganický anion** nebo je **vázán v organických sloučeninách**. Do organických sloučenin se zabudovává v kořeni nebo až v nadzemní části rostliny, kam je **transportován v anorganické formě xylémem**. Pi může být ve značném množství **skladován ve vakuolách**.

Navázání fosfátu na organickou látku se nazývá **fosforylace**. Fosfát reaguje s hydroxylovou skupinou vázanou na uhlíkatý řetězec za vzniku **esteru** (—C—O—P) nebo se skupinou —OH již navázaného fosfátu (tzv. pyrofosfátová vazba, $\text{P} \sim \text{P}$). **Odštěpení fosfátové skupiny** z organické látky se nazývá **defosforylace**. Esterové vazby fosfát rychle tvoří a rychle se z nich

uvolňuje. Stabilnější je **diesterová vazba** (—C—P—C—). Pro označení fosfátu vázaného v organických sloučeninách se často užívá P v kroužku (nepoužívám toto označení z technických důvodů).

Fosforylace a **defosforylace** hrají významnou roli v **energetickém metabolismu** rostliny. K **navázání anorganického fosfátu** na molekulu je třeba **dotat energii**. energii může dodat **protonmotorická síla** nebo **exergonická reakce**. Protonmotorická síla je využívána k navázání Pi na ADP a k vzniku ATP v **chloroplastech** při tzv. **fotofosforylaci** (kap. 3.2.3.) a k fosforylaci ADP na ATP v **mitochondriích** při tzv. **oxidativní fosforylaci** (kap. 4.4.). Tyto procesy jsou katalyzovány membránovými **ATP syntázami**. energii může poskytnout i **reakce oxidačně redukční**, např. při oxidaci 3-P-glyceraldehydu vzniká 1,3-P₂-glycerát za současné redukce NAD⁺ na NADH (reakce probíhá v cytosolu, je katalyzována 3-P-glyceraldehyd dehydrogenázou a je jednou z řetězce reakcí, který se označuje jako glykolýza; kap. 4.1., obr. 4-1., obr. 3-23.). **Organicky vázaný fosfát** může být přenesen na ADP za vzniku ATP při tzv. **substrátové fosforylaci** (např. vznik ATP při přeměně fosfoenolpyruvátu na pyruvát v glykolýze, kap. 4.1.).

V **rostlině** je fosfát součástí **látek s vysokým obsahem energie** – ATP, UTP, GTP, CTP a TTP. Tyto sloučeniny, především ATP (obr. 3-16.), reagují s množstvím dalších molekul, při čemž se **vnitřní energie** těchto látek **zvyšuje** a je tak umožněn jejich vstup do dalších metabolických procesů. Na molekule může zůstat vázaný **fosfát** (např. fosforylace 3-fosfoglycerátu na 1,3-bisfosfoglycerát před redukcí na 3-P-glyceraldehyd v Calvinově cyklu; kap. 3.3., obr. 3-20.), nebo **nukleotidifosfát** (např. vznik UDPglukózy v cytosolu pro tvorbu sacharózy a celulózy, ADPglukózy v plastidech pro vznik škrobu, kap. 3.3.4., obr. 3-25; CDPfosfatidátu pro vznik membránových fosfolipidů, kap. 3.6.2. Při těchto reakcích se ATP váže na fosforylovaný substrát a vzniká pyrofosfát – PPI). Vedle změn vnitřní energie molekula navázáním fosfátu získává **záporný pól**.

▼ Enzymy, které katalyzují **přenos fosfátu z ATP nebo GTP** na jinou organickou látku se nazývají **kinázy** (fosfokinázy), enzymy, které **odštěpují** fosfátovou skupinu z organické látky se nazývají **fosfatázy**. Enzymy, které **přemísťují fosfát** v rámci **jedné molekuly** se nazývají **fosfomutázy**.

V **proteinech** je fosfát vázán na zbytky polárních aminokyselin – **serinu, treoninu** nebo **tyrozinu**. Fosforylaci proteinů katalyzují **proteinové kinázy**. Fosforylace mění konformaci proteinů a může významně ovlivnit jejich **funkční vlastnosti**, např. **enzymatickou aktivitu** (aktivace a inaktivace pyruvátdehydrogenázy při vstupu pyruvátu do Krebsova cyklu; místo navázání fosfátu na základní proteinové podjednotce ovlivňuje funkci kináz dependentních na cyklinech v průběhu buněčného cyklu), **propustnost akvaporinových kanálů, lokalizaci proteinu v buňce** (transport fosforylovaného fytochromu z cytosolu do jádra a přenos signálu). **Fosforylační kaskády**, v nichž proteinové kinázy fosforylují další proteinové kinázy jsou důležitou součástí **přenosu signálu** (kap. 8.2.5.2.).

▲ **Proteinové kinázy** jsou velmi **různé proteiny**, **společná** je jim doména tvořená asi **300 aminokyselinovými zbytky**, kde se 12 velmi konzervovaných domén střídá s oblastmi méně konzervovanými.

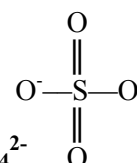
Oblast domény více nebo méně specificky určuje, který aminokyselinový zbytek bude fosforylován, oblasti mimo tuto doménu určují např. charakter regulace proteinové kinázy. V rostlinách je značné množství proteinových kináz, jsou klasifikovány a sdružovány do skupin podle funkce v buňce, strukturních charakteristik, specifity k substrátu a ligandů, které působí jejich aktivaci nebo inaktivaci. Rostliny obsahují značné množství proteinových kináz, které jsou aktivovány přímo Ca^{2+} (kap. 6.2.3.), nebo Ca^{2+} vázaným na kalmodulin – skupina CaMPK. Proteinové kinázy A jsou aktivovány cyklickým AMP, proteinové kinázy G cyklickým GMP, proteinové kinázy C jsou aktivovány diacylglycerolem (DAG), Ca^{2+} a fosfatidylserinem.

ATP, UTP, GTP, CPT a TTP slouží jako základní jednotky **syntézy nukleových kyselin**. V nukleových kyselinách **fosfát zůstává strukturně vázán** a dává jim kyselý charakter, důležitý pro interakce s dalšími makromolekulami, např. s bazickými histony nukleozomů. Strukturně je fosfát vázán také ve **fosfolipidech** membrán.

V **semenech** je fosfát uložen ve formě **kyseliny fytové**, substituované vápníkem a hořčíkem.

Kyselina fytová je derivátem cukerného alkoholu – *myo*-inositolu.

6.2.6. Síra



Síra je z **půdního roztoku** rostlinami přijímána ve formě **síranového aniontu** SO_4^{2-} (sulfátu). Sulfát v půdě pochází především ze **zvětralých mateřských hornin**. Síra je ve formě H_2S nebo **oxidů** (nejčastěji jako SO_2) obsažena také v **atmosféře**, kam se dostává při **spalování fosilních paliv** a při **vulkanické činnosti**. Na okrajích sopečných kráterů lze najít i elementární síru jako tzv. sirný květ. Některé chemoautotrofní mikroorganismy, např. *Thiobacillus*, získávají energii pro asimilaci CO_2 oxidací H_2S na SO_4^{2-} . Oxidy síry v atmosféře tvoří s vodou kyseliny a s vodními srážkami se v podobě kyselých dešťů dostávají do půdy.

Z atmosféry SO_2 vstupuje průdouchy do rostliny a nelze vyloučit, že může být metabolizován na sulfát a síra asimilována. Při dlouhodobě zvýšených koncentracích sirných látek v atmosféře však vznikající kyseliny působí hrubé poškození listů i jehlic.

V životním prostředí rostlin se sulfát obvykle vyskytuje v takovém množství, že nedostatek síry jako limitující faktor existence rostliny prakticky nepůsobí. Zvýšené nároky na množství sulfátu v půdě mají rostliny čeledi *Brassicaceae*. **Nedostatek S** se projevuje **chlorózou především mladých listů**, neboť asimilovaná S není v rostlině snadno distribuována ze starších částí rostliny do mladších. Dalším projevem nedostatku S je **zakrslost** a zvýšená syntéza antokyanů.

Rostliny **příjem sulfátu i asimilaci síry efektivně řídí** podle dostupnosti sulfátu v prostředí i podle potřeb rostliny. Sulfát může být **skladován ve vakuolách**.

Síra se v rostlinách vyskytuje v mnoha strukturně i funkčně odlišných látkách a může být ve **stavu oxidovaném i redukovaném** (S^{2-}). V molekule jedné látky může být síra přítomna v

obou formách, např. v glukosinolátech jako je sinapin a v dalších sekundárních metabolitech čeledi *Brassicaceae*. Živočichové včetně člověka nejsou schopni síru redukovat, v této formě je pro ně esenciální a získávají ji z rostlin.

Sulfát může být **přímo vestavěn do organických sloučenin** za vzniku **sulfurylové skupiny**. V této formě se síra vyskytuje nejčastěji v **sulfolipidech v membránách thylakoidů** (kap. 3.6.2.), v sekundárních metabolitech a v některých látkách signální povahy, např. v **Nod-faktorech** (kap. 6.2.1.).

Redukovaná síra tvoří **thiolovou skupinu –SH**. V této podobě se vyskytuje především v **cysteinu** a metabolitech z něj odvozených. Cystein je proteinová aminokyselina, thiolové skupiny cysteinových zbytků dávají proteinu možnost vázat různé **ligandy** (např. chromofor fytochromů na fytochromové proteiny), významně ovlivňují také terciární a kvartérní **strukturu proteinů** a tím i jejich **funkci**. Mezi vzdálenými zbytky cysteinu se tvoří **disulfidové můstky** $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$, které mohou být redukcí, tj. navázáním H_2 , zrušeny $-\text{CH}_2-\text{SH}$ $\text{HS}-\text{CH}_2-$. Vznik a rušení disulfidových můstků mění **aktivitu enzymů**, např. enzymů Calvinova cyklu jako jsou fosfatázy nebo ribulóza-5-P-kináza (kap. 3.4.2.). Thiolové skupiny cysteinových zbytků umožňují vytvořit **struktury Fe-S**, které **slouží přenosu elektronu**. Vyskytují se např. ve ferredoxinech, thioredoxinech, Rieskeho proteinu v cytochromových komplexech (fotosyntéza viz kap. 3.2.1., respirace viz kap.4.4.) a přenašečích elektronu ve fotosystému I. Ve strukturách $2\text{Fe}-2\text{S}$ jsou čtyřmi atomy síry cysteinových zbytků vázány dva atomy železa, mezi kterými jsou vázány další dva atomy síry (obr. 3-8.). Struktura může mít podobu také $4\text{Fe}-4\text{S}$. Atomy S vázané atomy Fe se mohou uvolňovat jako H_2S a struktura přestává být schopna přenášet elektron.

Cystein je však také výchozí látkou pro syntézu mnoha dalších metabolitů, např. **methioninu** (proteinová aminokyselina), **koenzymů**, které přenášejí skupiny (např. koenzym A), **vitaminů** – thiaminu (vitamin B1), biotinu (vitamin H; obr. 6-16.), **sekundárních metabolitů**, např. čpavých látek cibule a česneku (allicin).

Cystein je funkčně důležitou složkou skupiny látek, které se označují jako **nízkomolekulární thioly**. Jedním z nich je látka tvořená třemi aminokyselinami – **kys. glutamovou, cysteinem a glycinem (Glu–Cys–Gly)**. Glutathion (obr. 6-17.) nevzniká translací na ribozomech, jeho syntéza je katalyzována enzymy v cytosolu. Tato látka **váže** a tak **inaktivuje** řadu endogenních **toxinů** i exogenních cizorodých látek - **xenobiotik**, např. herbicidů. Vazbu katalyzují enzymy zvané **glutathion-S-transferázy**. Vzniklé komplexy jsou specifickými přenašeči glutathionu aktivně transportovány do vakuoly. Ve vakuole jsou komplexy hydrolyzovány, inaktivovaná látka zůstává ve vakuole v komplexu s cysteinem.

Glutathion je stavebním kamenem fytochelatinů. **Fytochelatiny (Glu–Cys)₂₋₁₁–Gly** inaktivují těžké kovy tím, že je vážou do komplexů. Thiolové skupiny cysteinu slouží ve fytochelatech k ligaci atomů těžkých kovů. Enzymy, které katalyzují vznik fytochelatinů, jsou aktivovány přítomností těžkých kovů.

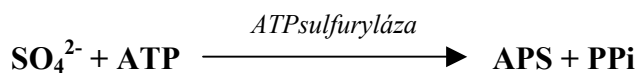
6.2.6.1. Příjem a asimilace sulfátu

Příjem sulfátu kořeny je aktivní, k transportu SO_4^{2-} přes membránu se využívá **protonmotorická síla** a uskutečňuje se symportem s 3H^+ . Příjem zajišťuje **vysoce afinitní systémem**. Geny, které kódují transportní proteiny tohoto systému, se **při nedostatku S dereprimují**. Jejich exprese je specifická pro kořeny.

Vedle tohoto transportního systému se v rostlinách vyskytují transportní proteiny s **nízkou afinitou k sulfátu**. Neslouží příjmu z vnějšího prostředí, ale importu sulfátu do xylému a jeho exportu z xylému a k transportu sulfátu mezi cytosolem a vakuolou, tedy v prostředí, kde je, ve srovnání s půdním roztokem, vyšší a relativně vyrovnaná koncentrace sulfátu. Tyto transportní proteiny se exprimují v kořenech i v prýtu.

Síra může být asimilována **přímým vestavěním sulfátu** do organických látek. Naprostá většina síry se však v rostlině vyskytuje v **redukované formě**. Při přeměně SO_4^{2-} na $-\text{SH}$ se mocnoství S mění z +6 na –2, proces je značně **náročný na redukční sílu a energii**. **Redukce sulfátu** a **asimilace S^{2-}** probíhá v nadzemní části rostliny v **chloroplastech**. V plastidech se vyskytují všechny enzymy potřebné k redukci a asimilaci síry. Jen velmi malé množství SO_4^{2-} je redukováno v plastidech kořenů. U rostlin C_4 je sulfát redukován v chloroplastech buněk pochev cévních svazků.

První krok **obou cest asimilace síry**, tj. přímého vestavění SO_4^{2-} nebo redukce a vestavění SH^- do organických sloučenin, je stejný a spočívá v navázání SO_4^{2-} na ATP za vzniku **APS** (adenosinfosulfát). Často se tato reakce označuje jako **aktivace sulfátu**. Vzniká při ní **PPi** (pyrofosfát). Reakce je katalyzována enzymem **ATPsulfurylázou**.



K vestavění SO_4^{2-} do organických látek je třeba další zvýšení vnitřní energie, APS reaguje s další molekulou ATP za vzniku **PAPS** (fosfoadenosinfosulfát), který předá sulfátovou skupinu na OH skupinu jiné látky. Reakce je katalyzována enzymem **PAPSsulfotransferázou** (obr.6-18.).

Reakce, vedoucí **k redukci sulfátu**, jsou více předpokládané než přesvědčivě doložené. Předpokládá se, že sulfát z APS je přenesen na redukovaný glutathion, tj. na **thiolovou skupinu cysteinového**

zbytku. Reakce je katalyzována enzymem APSulfottransferázou. Vzniká **sulfoglutathion** (thiosulfonát), který přijímá elektrony od redukovaného **ferredoxinu** a vzniká **thiosulfid**. Z thiosulfidu je thiolová skupina inkorporována do **cysteinu**. Nelze vyloučit, že u rostlin existuje ještě jiná cesta redukce, podobná té, která je známa u mikroorganismů včetně sinic. V této cestě aktivovaný sulfát není při redukcí vázán na nosič (glutathion) a elektrony potřebné k redukcí poskytují thioredoxin a ferredoxin. Ani existenci dvou alternativních cest nelze odmítnout.

Výchozí látkou pro **syntézu cysteinu** je serin. **Serin** přijímá od acetylkoenzymu A acetylovou skupinu, mění se na **acetylserin** a reaguje s H_2S za vzniku **cysteinu** a acetátu (obr. 6-18.). Dalšími metabolickými přeměnami vzniká z **cysteinu methionin**.

6.3. Mikrobiogenní minerální prvky

6.3.1. Chlór

Chlór je prvek v přírodě **všudypřítomný**, jeho anorganické soli jsou snadno rozpustné a Cl^- je snadno **pohyblivý** v půdním roztoku i ve vnitřním prostředí rostliny. V rostlinách bylo identifikováno také více než sto organických látek substituovaných chlorem. Obsah Cl^- v sušině různých druhů rostlin je velmi rozdílný, u některých druhů může dosáhnout hladiny obsahu makroelementů, funkční obsah je však nejčastěji v oblasti mikroelementů. Chloridové anionty spolu s Ca^{2+} **stabilizují komplex rozkládající vodu** asociovaný s fotosystémem II v chloroplastu (OEC, kap. 3.2.).

Zvýšená hladina Cl^- v cytosolu **aktivuje H^+ ATPázy a H^+ PPázy v tonoplastu** a následný transport Cl^- do vakuoly, kde vyrovnává náboj kationtů. **Cl^- spolu s K^+ hraje důležitou roli v osmotických poměrech buňky.** Experimentálně navozený **nedostatek Cl^-** se u dospělých rostlin projevoval vadnutím, u vyvíjejících se rostlin způsobil inhibici objemového růstu buněk. Významná úloha Cl^- **při otevírání a zavírání průduchů** (kap. 12.1.4.) byla experimentálně doložena především u těch rostlin, které ve svěracích buňkách postrádají zelené plastidy. Na **obsah Cl^- v půdě** mají různé druhy rostlin značně rozdílné nároky. Některé rostliny se se zvýšenou koncentrací Cl^- vyrovnávají obtížně, např. rhododendrony a azalky, jiné druhy, např. ječmen, salát, špenát nebo cukrová řepa, jsou naopak ke zvýšené hladině Cl^- v prostředí značně tolerantní.

6.3.2. Železo

Železo se v půdě nejčastěji vyskytuje jako Fe^{3+} v hydroxydech $Fe(OH)^{2+}$, $Fe(OH)_3$ nebo $Fe(OH)_4^-$, které jsou při neutrálním pH obtížně rozpustné. Železo v těchto formách není pro rostlinu snadno dostupné. Fe^{2+} , které je výrazně rozpustnější, se při obvyklém pH půdy (pH 6

až 8) na Fe^{3+} snadno oxiduje. Fe^{3+} tvoří s organickými látkami komplexy, zvané **cheláty**, které jsou stabilní a udržují Fe^{3+} v rozpustné formě. Jako **chelátory** mohou v půdě působit organické složky humusu nebo organické látky kořenových exudátů.

Kořeny dvouděložných i jednoděložných rostlin, mimo trávy (*Poaceae*), vylučují do půdy pro tvorbu chelátů s Fe^{3+} **fenolické látky**, např. **kyselinu kávovou**. Buňky rhizodermis mají na plazmatické membráně na straně k buněčné stěně asociovaný enzym **Fe^{3+} (chelát)reduktázu**, který **Fe^{3+} v chelátu redukuje na Fe^{2+}** a z vazby ho **uvolní**. Donorem elektronu pro redukci je NADH nebo NADPH. Fe^{2+} je transportováno přes membránu do cytosolu, chelátor zůstává vně kořene a může vázat další Fe^{3+} . **Transport Fe^{2+} přes plazmatickou membránu** zajišťuje patrně více typů transportních proteinů s různou afinitou k Fe^{2+} .

Nedostatek železa navozuje v kořenech fyziologické a biochemické reakce, které vedou ke zvýšení jeho příjmu. Rostliny aktivují H^+ ATPázy v plazmatické membráně rhizodermis a transportují do **rhizosféry** zvýšené množství **protonů**, které tuto oblast **okyselují**. Snížení pH působí také **zvýšená tvorba organických kyselin**, např. kyseliny citronové a jablečné, a jejich uvolňování do rhizosféry. Tyto kyseliny mohou také vázat Fe^{3+} v chelátech. Při nedostatku železa v rostlině se také **zvýšuje aktivita Fe^{3+} reduktázy**. U některých dvouděložných rostlin se vytváří hustý bohatě větvený kompaktní kořenový systém s **terciárními postranními kořeny** (zvaný proteoid), podobně jako při nedostatku fosforu. Při nedostatku železa se zvyšuje počet **kořenových vlásků**. U některých rostlin buňky rhizodermis (někdy i hypodermis) **zvětšují plochu plazmatické membrány**, která tvoří záhyby (buňky získávají charakter tzv. buněk transferových). Tato cytologická změna zvyšuje nejen plochu pro příjem Fe^{2+} ale patrně souvisí také se zvýšenou sekrecí H^+ (okyselování prostředí).

Rostliny čeledi *Poaceae* vyvinuly k získání železa specifickou strategii. Vylučují do rhizosféry látky zvané **fytosiderofory**, které **tvoří s Fe^{3+} komplexy**. Chemicky jsou fyto siderofory iminokarboxylové kyseliny odvozené z methioninu (např. kyselina avenová, obr. 6-19.). V plazmatické membráně buněk rhizodermis mají rostliny čeledi *Poaceae* **transportní systém**, který přenesení **komplex do cytosolu**. V cytosolu je ion Fe^{3+} z komplexu uvolněn, fyto siderofor je odbourán nebo se vrací do půdy. Stejně jsou přijímány také **jiné kovy** – Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} . Proto se pro tyto látky navrhuje obecnější název **fyto metalofory**.

Z kořene do nadzemní části je železo transportováno **xylémem jako Fe^{3+} v komplexu s citrátem**, v rostlině se železo ze starších do mladších částí **neredistribuuje**.

Železo slouží v rostlině **přenosu elektronu v oxidačně redukčních reakcích**. Železo strukturně **vázané v hemu** cytochromů (centrální atom porfyrinového kruhu) přenáší elektron v **cytochromovém komplexu** fotosyntetického aparátu v membráně thylakoidu (kap. 3.2.1.,

obr. 3-11., obr. 3-12.) i v cytochromovém a cytochromoxidázovém komplexu řetězce transportujícího elektron ve vnitřní membráně mitochondrie (kap.4.4.). Hemová skupina je funkční také v některých **enzymech**, např. v **nitrátreduktáze** (kap.6.2.1.2.), **kataláze** a v **peroxidázách**. Kataláza detoxikuje peroxid vodíku za vzniku vody a kyslíku. Peroxidázy vázané v buněčné stěně katalyzují polymerizaci fenolických látek na **lignin** a vznik **suberinu** (kap. 5.4.2.3.).

▲ **Peroxidázy** potřebují k polymeraci H_2O_2 , který vzniká oxidací NADH a redukcí O_2 na rozhraní plazmatické membrány a buněčné stěny. Při polymeraci vzniká voda (schéma reakce: $XH + XH + H_2O_2 \rightarrow X-X + 2 H_2O$).

Další struktury důležité pro přenos elektronů jsou centra **Fe-S** (viz kap. 6.2.6.). Proteiny s těmito strukturami se vyskytují např. ve fotosystému I a v Rieskeho proteinu cytochromového komplexu fotosyntetického aparátu, ve ferredoxinech a mnoha enzymech. Z **enzymů** jsou důležité především **superoxiddismutázy** (SOD).

▲ **Superoxiddismutázy (SOD)** jsou enzymy, které metabolizují a tím detoxikují volný kyslíkový radikál $O_2^{\cdot-}$ (superoxid) na H_2O_2 . Superoxid vzniká přenosem jednoho elektronu na O_2 . Vzniklý peroxid vodíku je dále detoxikován katalázou nebo peroxidázami. V rostlinách se superoxiddismutázy vyskytují v mnoha izoenzymech a mohou vázat i jiné kovy, např. Mn nebo $Cu+Zn$. **FeSOD** jsou charakteristické pro **chloroplasty**.

Přenosu elektronu na thylakoidní membráně se účastní asi 20 atomů Fe vázaných v obou typech těchto struktur – v cytochromech i ve strukturách Fe-S.

Železo je v rostlině **skladováno** především v chloroplastech ve specifické struktuře, zvané **fytoferritin**. Fytoferritin je tvořen **jádrem** a **proteinovým obalem**. Jádro obsahuje vysoký počet atomů Fe^{3+} (5 až 6 tisíc) ve formě oxidů a fosfátů. Fytoferritin se tvoří např. v chloroplastech během senescence listů, jako zásoba Fe v semenech, lze ho však najít i v xylému a floému. Tvorba fytoferritinu je v podstatě inaktivace volného Fe^{3+} , které může oxidovat některé látky, např. nenasycené mastné kyseliny v membránách nebo kyslík na superoxid.

Nedostatek Fe se projevuje tvorbou světlých skvrn mezi žilnatinou na mladých listech. Škodlivý je však také **nadbytek železa**, zejména na zatopených nebo velmi suchých stanovištích. Projevuje se poškozením chloroplastů, listy získávají bronzový odstín.

6.3.3. Bór

Atom bóru je malý, trojmocný a v anorganické formě se vyskytuje jako kyselina boritá – H_3BO_3 . **Kyselina boritá** je kyselina slabá, při pH nižším než 7 prakticky nedisociuje, při vyšším pH může s OH^- tvořit anionty $H_4BO_4^-$. Bór je do rostliny přijímán jako H_3BO_3 (jediný

prvek přijímaný v neiontové formě), v této podobě je distribuován xylémem a redistribuován floémem. Jeho úloha v rostlině není zatím zcela jasná, **projevy jeho nedostatku jsou však značně komplexní**. Obsah B v rostlinách je značně vysoký a předpokládá se, že jeho potřeba u rostlin vznikla s vývojem xylému a ligninu a jeho úloha v rostlině spočívá **primárně** v jeho **strukturní funkci v buněčné stěně**, kde se také většina bóru obsaženého v rostlině nachází (u dvouděložných rostlin je obsah B v buněčné stěně asi $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Kyselina boritá má výraznou schopnost tvořit komplexy s látkami, které obsahují hydroxylové skupiny v poloze *cis*. Takovými látkami jsou některé sacharidy (ribóza, apióza) a sacharidové alkoholy (manitol), které jsou stavebními složkami **hemicelulóz** v buněčné stěně, nebo fenolické látky jako jsou kyselina kávová nebo hydroxyferulová, které jsou složkami **ligninu**. Předpoklad, že bór je důležitý strukturní element buněčné stěny, se opírá mimo jiné o experimentální zjištění, že prodlužování buněk kořene ustane, přenesou-li se rostlina do media, které neobsahuje B. Také nezbytnost B pro klíčení pylu a růst pylové láčky je experimentálně spolehlivě potvrzena. Při nedostatku B buněčná stěna obsahuje více pektinů, je silnější, obsahuje charakteristické vezikulární struktury a tvorba ligninu je snížena. Snížená tvorba ligninu souvisí se zvýšenou hladinou volných fenolických látek, které mohou ovlivňovat další metabolické cesty, např. sníženou tvorbu flavonoidů. Nedostatek bóru **se projevuje také ve vlastnostech plazmatické membrány**, např. sníženou aktivitou ATPáz, sníženým příjmem fosfátu a zvýšeným únikem K^+ . I v tomto případě se předpokládá, že funkce B je strukturní a souvisí s interakcí plazmatické membrány s buněčnou stěnou neboť jiné membrány v buňce nedostatkem B ovlivněny nejsou. Také ostatní popsané efekty nedostatku bóru, např. snížená tvorba RNA, změny v sacharidovém metabolismu, narušená polarita buněk, dezintegrace stonkových meristémů, tvorba dutin ve dřeni stonků, jsou považovány za projevy sekundární, odvozené ze změněných vlastností buněčné stěny.

6.3.4. Mangan

V půdě se Mn vyskytuje ve formě nerozpustných oxidů jako Mn^{2+} , Mn^{3+} a Mn^{4+} nebo vázán v organických komplexech – **chelátech**. Do rostliny je přijímán ve formě Mn^{2+} , strategie jeho získávání je podobná strategii, kterou rostliny vyvinuly pro získávání Fe^{2+} .

Mangan je důležitou funkční složkou proteinového **komplexu rozkládajícího vodu (OEC)**, který je asociován s fotosystémem II (kap. 3.2.2.), a asi 35 **enzymů**, především dekarboxyláz a dehydrogenáz **Krebsova cyklu**, mitochondriálních **superoxiddismutáz** (MnSOD; kap. 6.3.2.), chloroplastových **RNApolymeráz** a **fenylalaninamoniumlyázy** (PAL). Podobně jako Mg může zprostředkovat **interakci proteinů s ATP** a v některých případech může být

Mn^{2+} hořčíkem funkčně zastoupen. Mangan však váže ATP čtyřikrát silněji než Mg a proto je jeho množství v cytosolu a ve stromatu chloroplastů řízeno a aktivně **udržováno nízké**. Nadbytek Mn je ukládán ve vakuole.

Nedostatek Mn se projevuje tvorbou drobných světlých našedlých skvrn mezi žilnatinou, které nekrotizují. Zasahuje především **chloroplasty**, v nichž se dezintegrují thylakoidy. Nedostatek Mn se nevyskytuje často.

6.3.5. Zinek

Zinek je přijímán jako Zn^{2+} , xylémem je transportován v této formě jen ve velmi malém množství, převážně je transportován vázaný na organické kyseliny. V organických komplexech je také Zn v rostlině **redistribován floémem**.

Příjem je aktivní, existují vysoce afinitní transportéry Zn^{2+} i transportéry s nízkou afinitou. Transportní proteiny jsou specifické pro membrány různého typu a podléhají specifické regulaci. **Trávy** přijímají Zn vázaný na **chelátor** typu fyto sideroforů (fyto metaloforů; kap. 6.3.2.). Zinek se v rostlině vyskytuje vždy jako Zn^{2+} a **nepodléhá oxidaci a redukci**. Váže se na molekuly organických látek přes atomy S, N a O a je důležitou **strukturní** složkou řady **enzymů, transportních proteinů a regulačních proteinů**, např. transkripčních faktorů se strukturou **zinkových prstů** nebo **zinkových shluků** (klastrů). V enzymech se může Zn přímo podílet na vytváření struktury vazebného místa pro substrát (funkce katalytická) nebo se vazbou Zn na jinou část proteinu aktivní katalytická struktura vytvoří (funkce strukturní). V jednom enzymu může Zn plnit obě funkce, např. u **alkoholdehydrogenázy**, která v jedné molekule proteinu váže 2 atomy Zn. Strukturní úlohu hraje atom Zn v **CuZn-superoxiddismutázách** (kap. 6.3.2; 6.3.6.) a v **aldoláze** (enzym katalyzuje reverzibilní přeměnu 3-P-glyceraldehyd + dihydroxyaceton-P \leftrightarrow fruktóza-1,6-bisfosfátu v chloroplastu i v cytosolu). Z transportních proteinů je vázán v některých formách **H⁺PPáz** (kap.6.1.2.1.). Významně ovlivňuje **stabilitu ribozomů a integritu membrán**.

Nedostatek Zn se projevuje výrazným zkrácením internodií, zmenšením plochy listových čepelí a odumíráním vzrostných vrcholů. **Nadbytek Zn** působí chlorózu mladých listů. Druhy rostlin tolerantních k nadbytku Zn tento ion vážou v komplexech s kyselinou jablečnou a citrónovou, které ukládají ve vakuolách především v buňkách kořenů.

6.3.6. Měď

Měď tvoří stabilní **komplexy s organickými sloučeninami**, kde se váže na thiolové, karboxylové nebo fenolické skupiny, v půdě tvoří komplexy s organickými látkami podobně jako

Fe, Mn a Zn. Volná se v rostlině prakticky nevyskytuje, také xylémem je transportována v komplexech s organickými látkami.

Měď velmi snadno **přijímá a uvolňuje elektron** ($\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^+$) a tvoří důležitou složku struktur **přenášejících jeden elektron**, např. **plastocyaninu** (primární fáze fotosyntézy, PS I, kap. 3.2.2.) nebo v **cytochromoxidázovém komplexu** (elektrontransportní řetězec, konečná fáze respirace, kap. 4.4.). Je součástí **enzymů**, které katalyzují **oxidačně redukční reakce**, především oxidáz, peroxidáz, polyfenoloxidáz a superoxididismutáz (spolu se Zn – CuZnSOD; kap. 6.3.2.). **Polyfenoloxidázy** se vyskytují především v buněčné stěně, kde se podílejí na tvorbě **ligninu**, a v membráně thylakoidů, kde se podílejí na syntéze **chinonu**. **CuZnSODismutázy** působí především proti oxidaci nenasycených mastných kyselin a vyskytují se v mnoha formách v cytosolu, mitochondriích i v chloroplastech. V těchto enzimech je Cu přímým detoxikačním elementem zatímco funkce Zn je strukturální.

Nedostatek Cu se projevuje především na mladých listech, které jsou malformované (tvarově abnormální), tmavě zelené a často zkroucené. Na koncích listů se objevují nekrotické skvrny.

Vysoké koncentrace mědi v půdě mohou být pro rostlinu toxické. Působí poškození plazmatické membrány buněk kořene a inhibici růstu kořenů. Některé rostliny jsou k vysokým hladinám Cu tolerantní (např. silenka – *Silene cucubalus*). Podstatou tolerance je vazba mědi v buněčné stěně, omezená prostupnost plazmatické membrány pro tento element nebo vyvázání atomu Cu do komplexů s organickými látkami (organickými kyselinami nebo fytochelatiny; kap. 6.2.6.) a uložení do vakuol.

6.3.7. Nikl

Nikl je svými vlastnostmi podoben železu, obsah v sušině se pohybuje mezi 1 až 10 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Většina Ni v rostlině je přítomna jako Ni^{2+} , může se však vyskytovat také jako Ni^+ a Ni^{3+} . Tvoří komplexy s kyselinou citronovou a s cysteinem (důležité pro transport), přes atomy S, N nebo O se může **vázat na proteiny** a ovlivňovat **aktivitu enzymů**, především hydrolytických. Nikl je **strukturální složkou ureázy** (každá ze 6 podjednotek váže 2 atomy Ni), důležitého enzymu v **metabolizmu dusíku**.

▲ **Ureáza štěpí močovinu** (ureu) na NH_4^+ a CO_2 , amonný kation je znovu asimilován vazbou na kyselinu glutamovou. **Močovina je degradační produkt allantoinu a allantoátu**. Allantoin a allantoát vznikají jako produkty **oxidativní degradace purinových látek**. V rostlinách mohou sloužit transportu dusíku na dlouhé vzdálenosti. Allantoin a allantoát tvoří některé druhy rostlin čeledi *Fabaceae* při asimilaci NH_4^+ , který vzniká při **symbiotické fixaci N_2** s hlízkovými bakteriemi (kap. 6.2.1.4.).

6.3.8. Molybden

Molybden se vyskytuje ve vodných roztocích jako molybdenanový anion MoO_4^{2-} (Mo^{6+}) a v této formě je přijímán a distribuován po rostlině xylémem i floémem. Jako **strukturní i katalytický kofaktor enzymů** katalyzujících **oxidačně redukční reakce** se však může vyskytovat také jako Mo^{4+} a Mo^{5+} . Molybden je prvek nezastupitelný v **metabolizmu dusíku a síry**. Molybden je složkou **nitrátoreduktázy** (kap. 6.2.1.2.; obr. 6-9.) a **sulfitoreduktázy** (kap. 6.2.6.1.; obr. 6-18.). Aktuální potřeba Mo v rostlině závisí na formě přijímaného dusíku. Převládá-li ve výživě NO_3^- , stoupá také potřeba Mo.

Mo je také složkou **nitrogenázy**, enzymu, kterým **prokaryotické organizmy** žijící v **symbióze** s vyššími rostlinami **fixují vzdušný N_2** (kap. 6.2.1.4.).

6.4. Prvky prospěšné (benefiční) a jiné

Jako benefiční se označují prvky, které **růst stimuluji**, ale pro samu existenci rostliny nejsou nezbytné, nebo prvky, které jsou **nezbytné jen pro některé rostliny** nebo jsou **nezbytné jen za určitých podmínek**. Takovými prvky jsou především sodík, křemík a kobalt.

Sodík se vyskytuje v zemské kůře v množství srovnatelném s draslíkem (Na asi 2,8%, K asi 2,6%). V půdním roztoku v suchých a uměle zavlažovaných oblastech může koncentrace Na^+ dosáhnout 50 až 100 mM.

Poloměr hydratovaného Na^+ je 0,358 nm, u K^+ je 0,331 nm a většina rostlin je schopna tyto hydratované ionty rozlišovat a přijímat selektivně. Ve schopnosti Na^+ přijímat nebo nepřijímat, vylučovat nebo transportovat Na^+ do nadzemní části jsou mezi rostlinami výrazné rozdíly, značné rozdíly existují často i mezi jednotlivými genotypy jednoho druhu.

Sodík je považován za **esenciální mikroelement** pro **některé druhy rostlin C4** z čeledi *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* a *Cyperaceae* a pro **některé rostliny CAM** (kap. 3.3.2.), především za podmínek nízkých hladin CO_2 v prostředí. Při nedostupnosti Na^+ tyto rostliny mají chlorotické skvrny na listech, zpomalený růst a netvoří květy. Pozitivní vliv Na^+ je spolehlivě experimentálně doložen, nikoli však uspokojivě vysvětlen. Předpokládá se, že souvisí s transportem pyruvátu přes vnitřní obalovou membránu chloroplastů v mezofylových buňkách. Některé rostliny C4, např. cukrová třtina, jsou však natrofobní.

U některých druhů rostlin je Na^+ prvek pouze **prospěšný**. U některých druhů z čeledi *Chenopodiaceae* (cukrová řepa, tuřín) může být K^+ do určité míry nahrazen Na^+ a při dostatečném zásobení K^+ může určité malé množství Na^+ podpořit růst. U jiných druhů rostlin, např. rýže, ječmene, prosa, rajčete, bramboru, je zastoupení K^+ sodným kationtem možné jen v omezené míře, u některých, např. u žita, soji, bojínku, fazolu, je K^+ sodným kationtem zcela nezastupi-

telný a stimulace růstu se nevyskytuje vůbec, naopak u fazolu se projev nedostatku K^+ aplikací Na^+ prohlubuje.

Křemík je druhý nejhojnější prvek zemské kůry, kde se vyskytuje jako SiO_2 , ve vodných roztocích tvoří slabou kyselinu tetrahydrogenkřemičitou $Si(OH)_4$. Podobně jako kyselina boritá, $Si(OH)_4$ tvoří **komplexy s pektiny a polyfenoly**, v rostlině se vyskytuje v **buněčné stěně**, funkce je **strukturní**. Obsah SiO_2 v sušině je u různých druhů rostlin značně odlišný, u přesličky – *Equisetum arvense* nebo rýže může tvořit 10 až 15%, u trav, obilnin a některých dvouděložných rostlin 1 až 3%, u většiny dvouděložných méně než 0,5%. Příjem $Si(OH)_4$ je řízen a je aktivní i při vysokých koncentracích $Si(OH)_4$ v prostředí. $Si(OH)_4$ je transportována xylémem, kde část zůstává vázaná v **sekundární buněčné stěně**. Naprostá většina přijaté $Si(OH)_4$ je lokalizována v apoplastu, v buňkách epidermis trav může být uložena i intracelulárně. Ovlivňuje vlastnosti buněčné stěny a přes tvorbu ligninu může sekundárně ovlivňovat metabolismus fenolických látek.

Kobalt je prvek **esenciální pro prokaryotické mikroorganismy fixující N_2** a jeho **prospěšnost** pro rostliny se projevuje lepším zásobením dusíkem **jen při symbióze** s diazotrofními organismy. Při fixaci N_2 má bakterie zvýšený požadavek na obsah Co v prostředí, tedy především v buňkách kořene, kde dochází z množení bakterií, vzniku nodulů a vlastní fixaci N_2 . Mimo jiné metabolické procesy (syntéza DNA) v mikroorganismu je Co důležitý pro **katalýzu vzniku leghemoglobinu**.

▲ **Selen** je svými vlastnostmi podobný síře, přijímán je jako selenanový anion SeO_4^{2-} , patrně stejnými transportními proteiny jako SO_4^{2-} a stejnou cestou je také asimilován. Ve vztahu k selenu existují mezi různými druhy rostlin výrazné rozdíly. Některé druhy čeledi *Brassicaceae* a druhy rodu *Astragalus* tento prvek kumulují ve značném množství bez známek poškození. Selen je **pro živočichy i člověka esenciální mikroprvek**, jeho vysoké dávky dlouhodobě konzumované však mohou působit zdravotní potíže vedoucí až k nemohoucnosti a úmrtí. Vysoký obsah selenu v rostlinách může působit značné potíže zvířatům, která se rostlinami na půdách bohatých selenem pasou. Rostlinám s vysokým obsahem selenu se někteří živočichové a druhy škodlivého hmyzu vyhýbají, v čemž tkví podstata prospěšnosti Se ve většině popsáných případů. V jiných situacích, např. u druhu *Astragalus*, selen snižuje nepříznivé efekty nadbytečného příjmu fosfátů.

6.4.1. Hliník

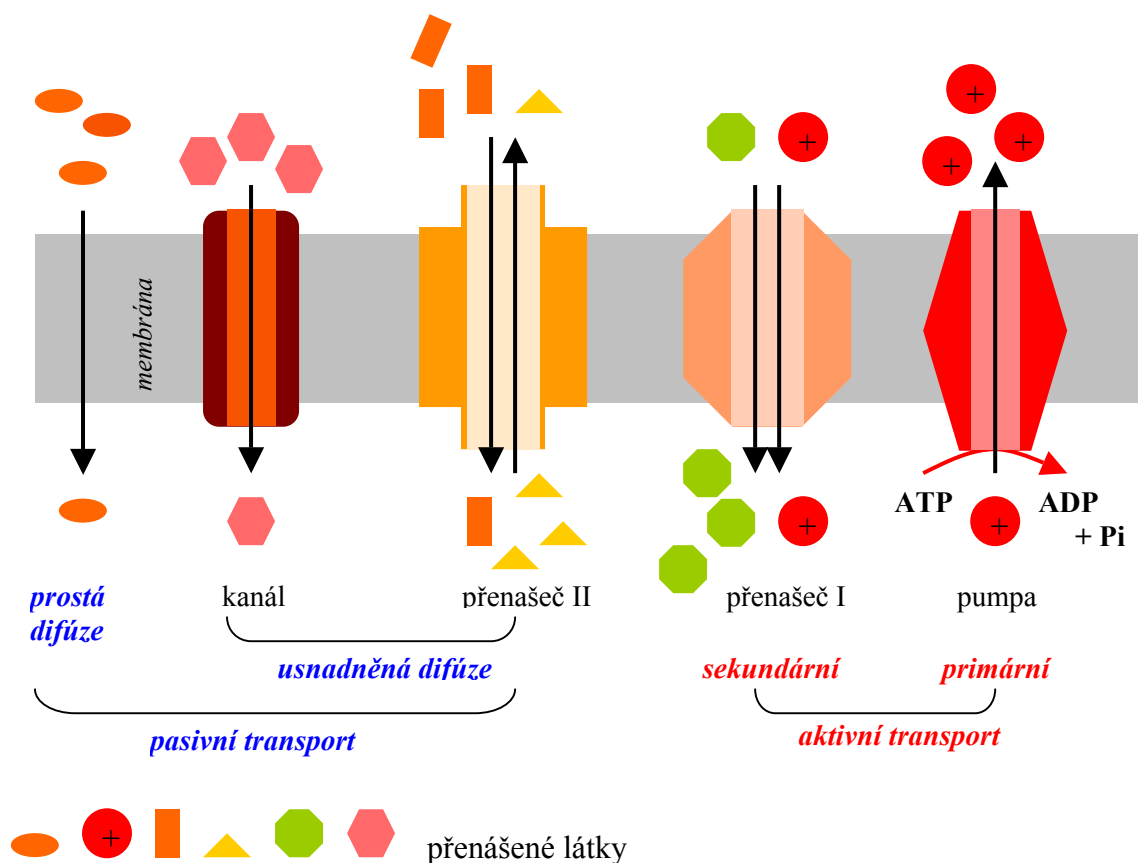
Hliník tvoří asi 8% zemské kůry, je nejčtenějším kovem a třetím nejčtenějším prvkem zemské kůry. Obsah a forma, ve které se Al vyskytuje v půdním roztoku, závisí na pH. Při pH nižších než 5,5 obsah Al v půdním roztoku výrazně stoupá. Při pH nižších než 5 se Al vyskytuje především jako Al^{3+} , při pH 5 až 6 jako $Al(OH)^{2+}$ a $Al(OH)_2^+$, při pH vyšších než 6 převážně jako $Al(OH)_4^-$. Obsah Al v půdním roztoku je při obvyklých pH nižší než $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Al není esenciální prvek, v nízkých koncentracích v živných roztocích může za určitých podmínek stimulovat růst kořenů, podstata tohoto efektu však spočívá v tom, že zmírňuje toxický efekt nadbytku jiných mikroelementů, např. Zn. **Prospěšnost Al je výjimečná.**

Okyselování půdy, působené kyselými dešti a aplikací umělých hnojiv s obsahem NH_4^+ , vede ke **zvýšené koncentraci Al^{3+}** v půdním roztoku, ke spontánnímu vstupu Al^{3+} do rostliny a k jejímu poškození, neboť Al^{3+} je forma hliníku pro rostliny toxická (toxicita ostatních forem Al je výrazně nižší). **Poškození působené hliníkem je komplexní.** Al^{3+} blokuje transportní kanály pro Ca^{2+} a K^+ v plazmatické membráně. Může se vázat na organické látky přímo nebo na jejich anorganické ligandy (na fosfát v nukleotidech a proteinech nebo na thiolové a sulfurylové skupiny v proteinech). Poškození působené Al^{3+} se projevuje především inhibicí dlouhivého růstu buněk v apikální části kořene, při vyšších koncentracích narušením struktury pletiv a základních funkcí kořenového systému. Narušení funkcí kořene se projeví také poškozením nadzemní části rostliny, které působí nedostatek vody a minerálních látek.

Různé druhy rostlin jsou ke zvýšeným hladinám Al^{3+} různě citlivé. Některé rostliny jsou k hliníku značně rezistentní. Rezistence může spočívat v inaktivaci Al^{3+} vytvořením komplexů s organickými látkami v buňce a jejich uložením ve vakuole. Druhý typ strategie je vylučování organických látek (malát, citrát) do rhizosféry a vytvoření komplexů Al^{3+} s organickými kyselinami mimo vnitřní prostředí buněk kořene.

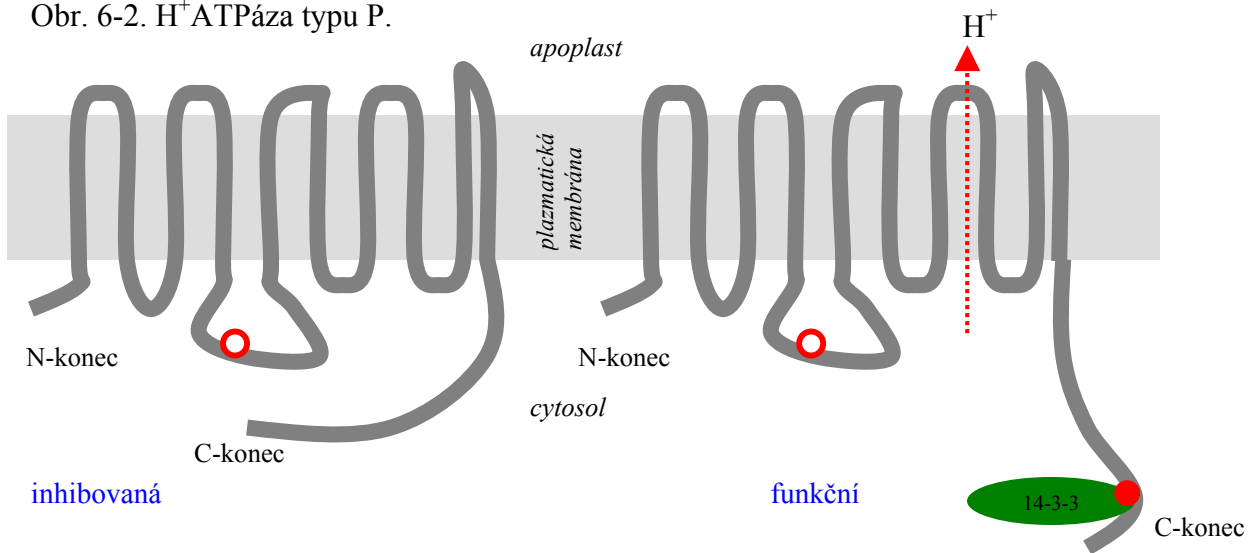
Obr. 6-1. Schéma transportních mechanismů v membráně.



[zpět do textu](#)

Některé molekuly, např. CO_2 , O_2 , NH_3 , mohou lipidovou dvouvrstvu překonávat spontánně prostou difúzí na základě rozdílu svého chemického potenciálu (sledují koncentrační spád). Transport látek, které nejsou schopny lipidovou dvouvrstvu překonat, např. ionty, sacharidy, aminokyseliny, umožňují transportní proteiny. Podle mechanismu přenosu se transportní proteiny označují jako pumpy (kap. 6.1.2.1.), přenašeče (kap. 6.1.2.2.) nebo kanály (kap. 6.1.2.3.). Pumpy k transportu využívají přímo energii ATP – transport je primární aktivní, při přenosu protonu do kompartmentu s jeho vyšším elektrochemickým potenciálem vzniká protonmotorická síla. Některé přenašeče (I) využívají protonmotorickou sílu k transportu látek přes membránu do míst, kde je elektrochemický potenciál přenášené látky vyšší – sekundární aktivní transport (na obrázku je schématicky znázorněný symport). Jiné typy přenašečů (II) přenášejí látky ve směru jejich koncentračního spádu, energii transport nespotřebovává (je pasivní, transportní protein usnadňuje difúzi). Kanály zprostředkují přenos přes membránu ve směru spádu koncentrace přenášené látky, usnadňují difúzi.

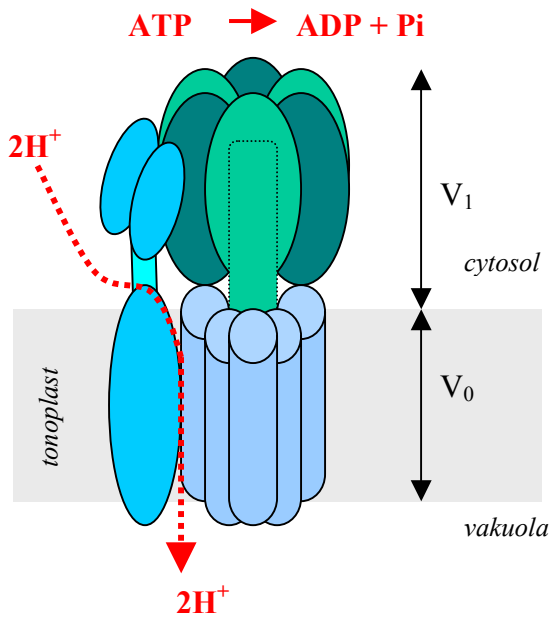
Obr. 6-2. H^+ ATPáza typu P.



- vazebné místo pro ATP; štěpení ATP poskytuje energii k přenosu H^+ z cytosolu do apoplastu
- ATP navázané na C-konci; umožňuje navázání regulačního proteinu (14-3-3), komplex odstraňuje autoinhibici H^+ ATPázy

zpět do textu

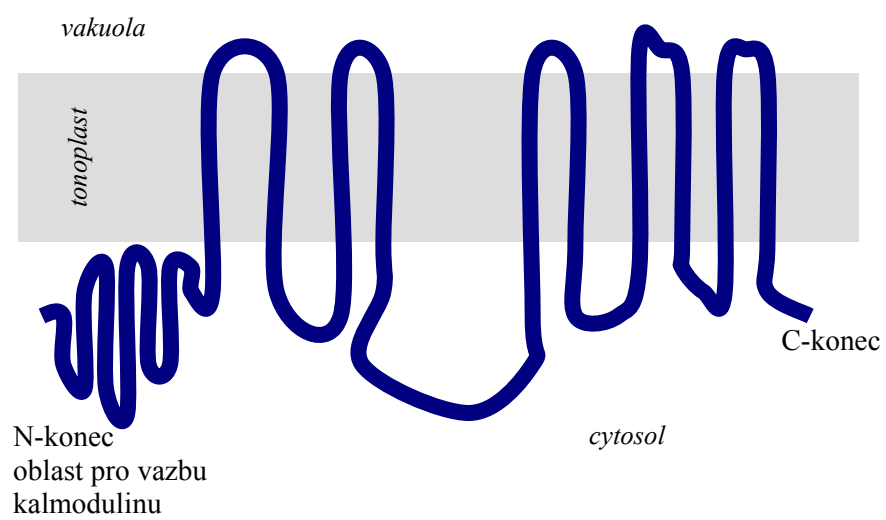
Obr. 6-3. H^+ ATPáza typu V (velmi zjednodušené schéma).



H^+ ATPázy typu V jsou tvořeny větším počtem proteinových podjednotek, uspořádaných do dvou základních komplexů. Transportním komplexem V_0 lokalizovaným v tonoplastu a katalytickým komplexem V_1 lokalizovaným v cytosolu, který snadno disociuje. Komplex V_1 štěpí ATP, energie je využívána k transportu H^+ z cytosolu do vakuoly.

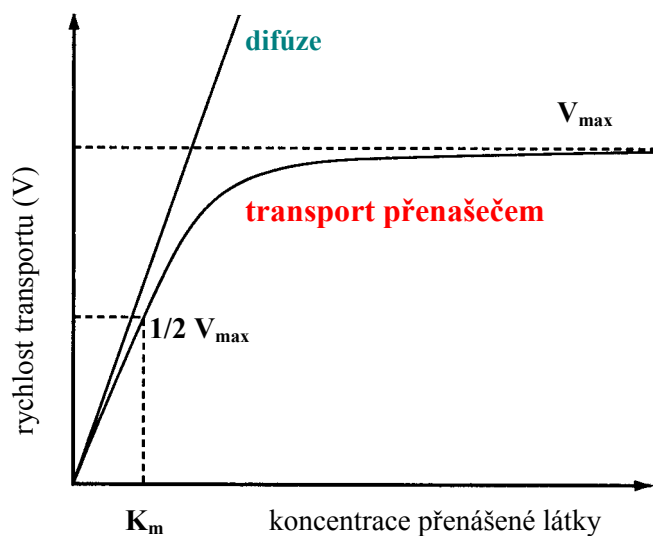
zpět do textu

Obr. 6-4. Ca^{2+} ATPázy v tonoplastu (zjednodušené schéma).



zpět do textu

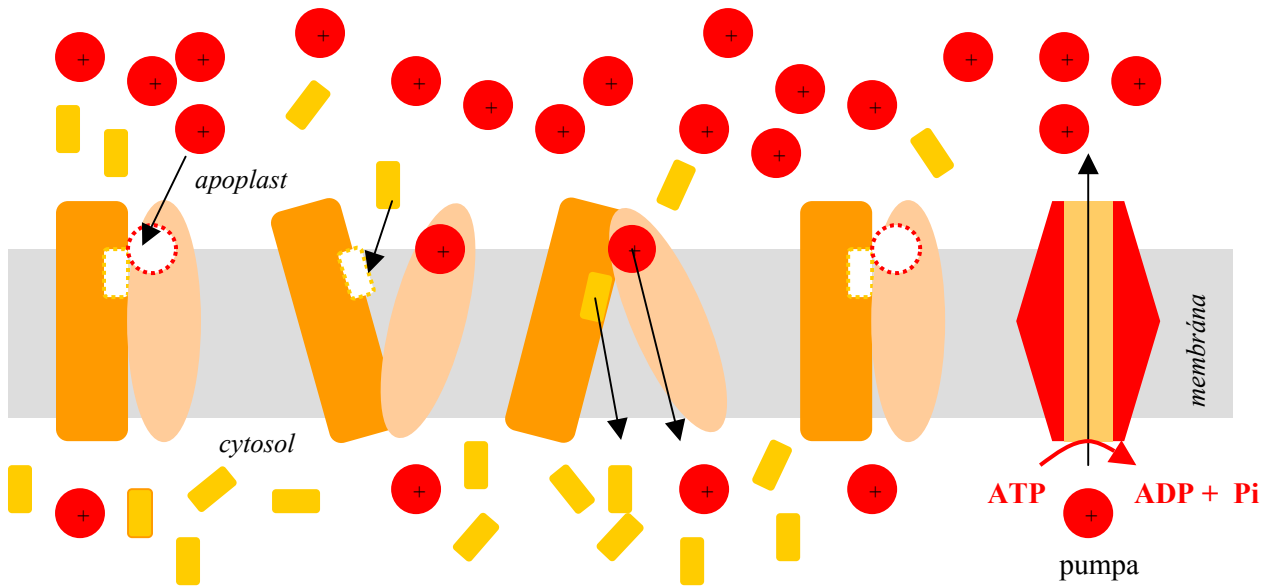
Obr. 6-5. Kinetika transportu látky přes membránu prostou difúzí a přenašečem.



Při prosté difúzi je rychlost transportu látky přes membránu přímo úměrná její koncentraci. Při přenosu látky přenašečem rychlost transportu stoupá lineárně jen při nízkých koncentracích přenášené látky. Při vysokých koncentracích je přenos limitován možnostmi přenašeče (počtem volných míst schopných přenášet látku transportovat), transport látky přenašečem je **saturovatelný**. Koncentrace látky, při níž je rychlost transportu poloviční, než maximální možná, se označuje K_m , charakterizuje vlastnosti přenašeče a odpovídá konstantě Michaelise a Mentenové pro enzymatické reakce.

[zpět do textu](#)

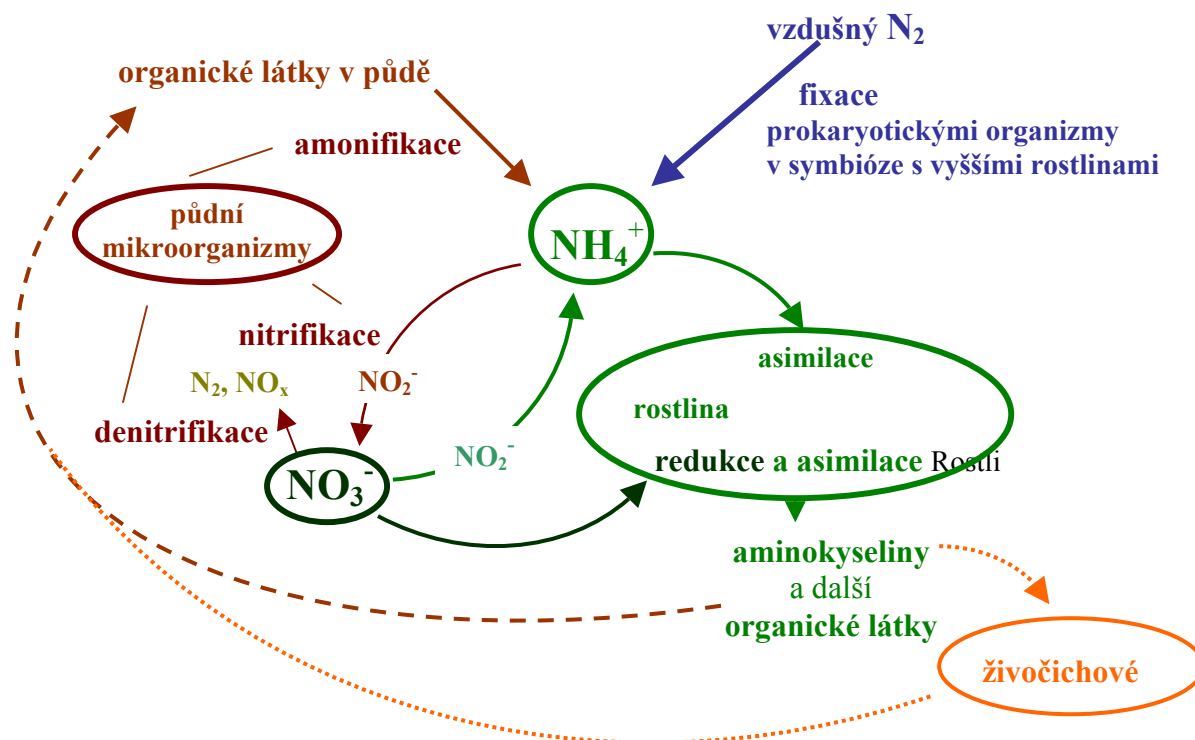
Obr. 6-6. Schéma sekundárního aktivního transportu látek přenašečem přes membránu.



Pumpa (H^+ ATPáza) přenáší z cytosolu do apoplastu H^+ (proton). Přenašeč naváže H^+ , změní konformaci a získá schopnost navázat přenášenou látku. Vazba navodí takovou strukturní změnu přenašeče, která umožní, aby se proton i přenášená látka uvolnily na druhé straně membrány.

[zpět do textu](#)

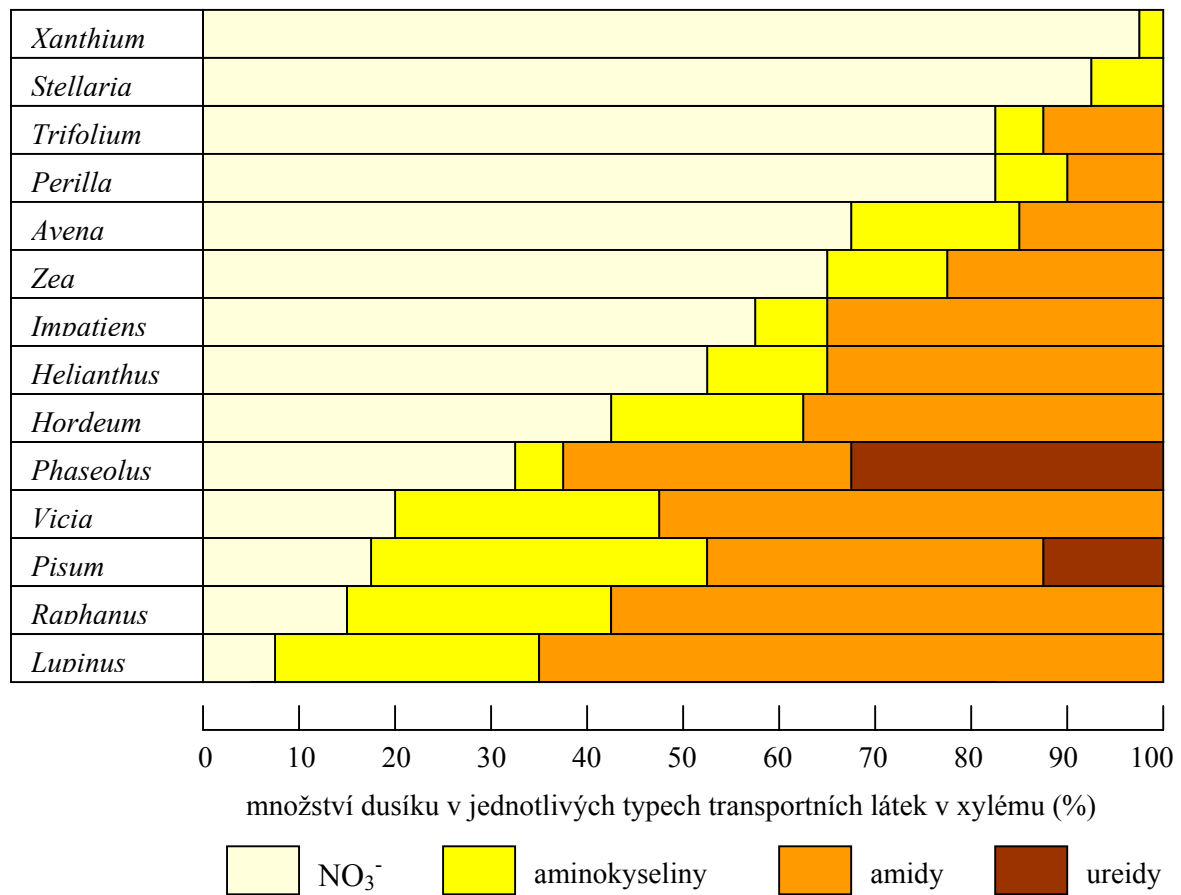
Obr. 6-7. Schéma koloběhu N v biosféře.



zpět do textu

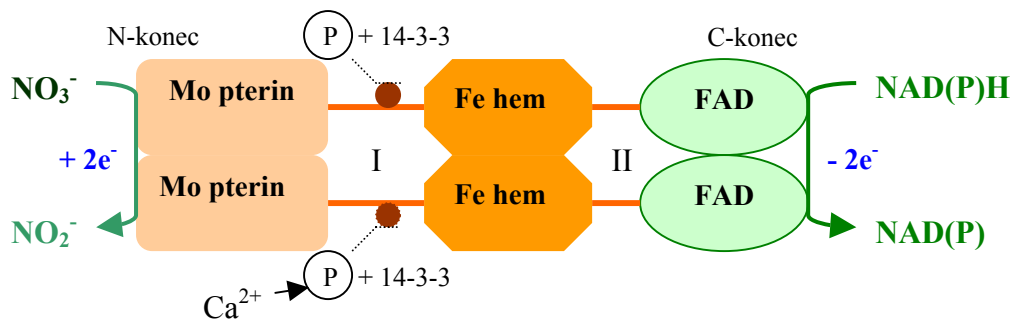
Rostliny přijímají z půdy N ve formě NH_4^+ nebo NO_3^- . Nitrát je redukován v cytoplasmě na NO_2^- a v plastidech na NH_4^+ . Amonný kation mohou rostliny získávat také od prokaryotických mikrosymbiontů, které jsou schopny redukovat (fixovat) vzdušný N_2 . Amonný kation je v rostlinách zabudováván (asimilován) do aminokyselin a dalších z aminokyselin odvozených látek. Živočichové získávají organicky vázaný dusík z rostlin. Z odumřelých těl, exkrementů a exudátů rostlin a živočichů se dostávají organické látky do půdy. V půdě jsou organické látky půdními mikroorganismy rozkládány a dusík je jako NH_3 uvolňován do půdy (amonifikace). NH_3 se rozpouští ve vodě na NH_4^+ , z půdního roztoku může být přijat a asimilován rostlinami nebo oxidován půdními mikroorganismy na nitrát NO_3^- (nitrifikace). Vzniklý NO_3^- může být dalšími mikroorganismy přeměněn na oxidy (NO_x) nebo N_2 (denitrifikace).

Obr. 6-8. Množství N v jednotlivých typech transportních látek v xylému (%) u různých druhů rostlin. (Podle Pate J.S.: Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. – Soil. Biol. Biochem. 5: 109 – 119, 1973. Upraveno.).



zpět do textu

Obr. 6-9. Nitrátreduktáza – schéma.

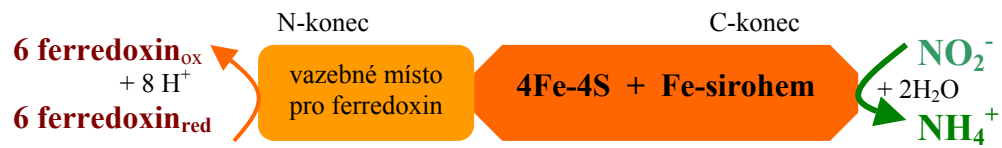


Nitrátreduktáza (NR) katalyzuje redukci NO_3^- na NO_2^- . Enzym je **homodimer**, každá podjednotka má tři části důležité pro vazbu kofaktorů (FAD, Fe v hemu a Mo v komplexu s pterinem), které přenášejí elektrony. Donorem elektronů je NADH nebo NADPH. Reakce probíhá v cytosolu. Oblasti I a II jsou důležité pro vznik dimeru a regulaci aktivity enzymu. ● v regulační oblasti I značí serinový zbytek, který může být fosforylován (P) specifickou kinázou, fosforylace umožní vazbu regulačních proteinů ze skupiny 14-3-3 a reverzibilní inaktivaci nitrátreduktázy. Enzymatické odštěpení regulačních proteinů a fosfátu (specifickou fosfatázou) vede k opětné aktivaci enzymatické aktivity.

zpět do textu na str. 15

do textu na str. 38

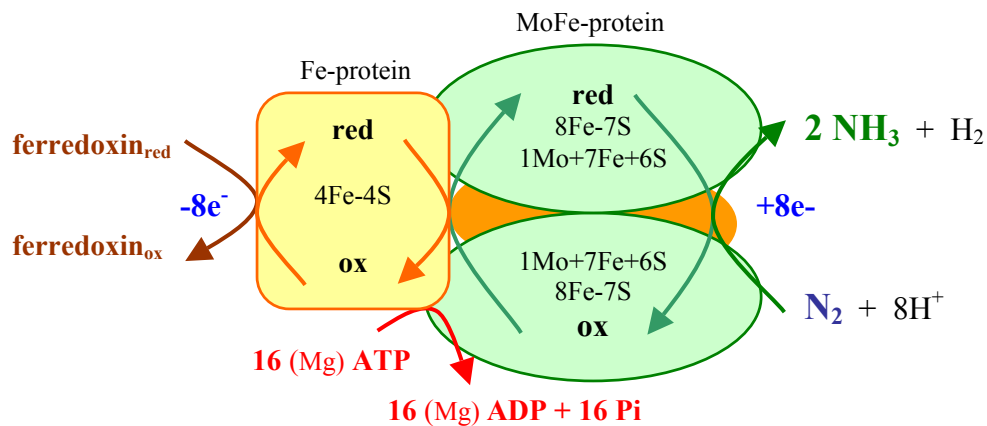
Obr. 6-10. Nitritreduktáza – schéma.



Nitritreduktáza katalyzuje redukci nitritu na amonný kation, reakce probíhá v plastidech, protein enzymu je kódován v jádře. Donorem elektronu je ferredoxin.

zpět do textu

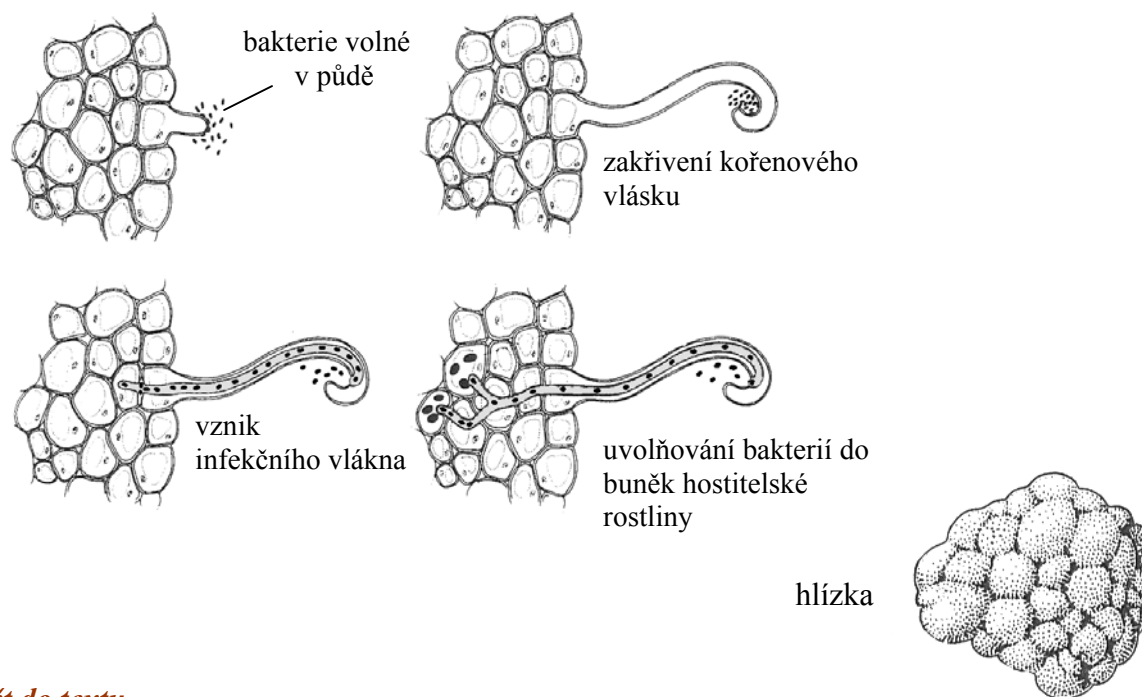
Obr. 6-11. Nitrogenáza – schéma.



zpět do textu

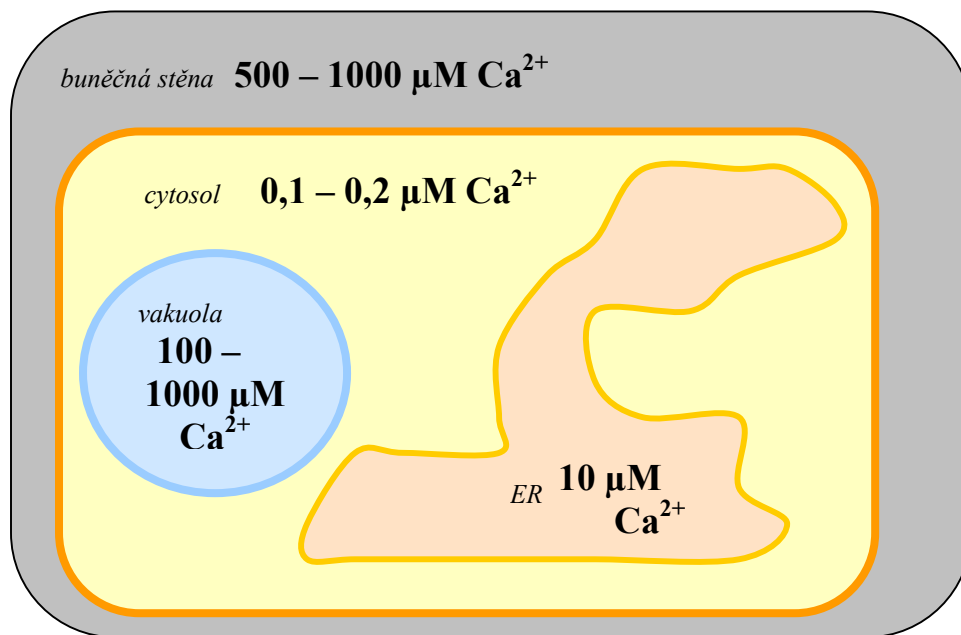
Enzym nitrogenáza katalyzuje redukci vzdušného dusíku (N₂) na NH₃ u **prokaryotických** organismů. Osm elektronů potřebných k redukci poskytuje redukovaný ferredoxin nebo flavodoxin (protein s FMN). Nitrogenáza se skládá ze dvou hlavních částí: Fe-proteinu a MoFe-proteinu. Fe- protein váže redukovaný ferredoxin a ATP (pro vazbu je nezbytný Mg), jehož štěpením se získává energie nezbytná pro transport elektronu na MoFe protein. Ke štěpení APT jsou nezbytné obě části enzymu. MoFe-protein váže N₂ a katalyzuje jeho redukci na NH₃.

Obr. 6-12. Průběh infekce buněk kořene nodulující bakterií (*Rhizobium*), první fáze symbiózy a hlízka.



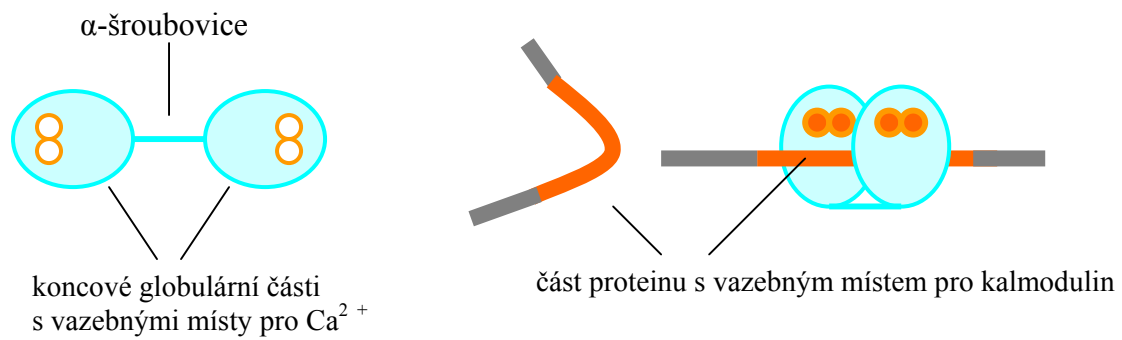
[zpět do textu](#)

Obr. 6-13. Obsah vápníku v různých kompartmentech buňky. *ER* – endoplazmatické retikulum



zpět do textu

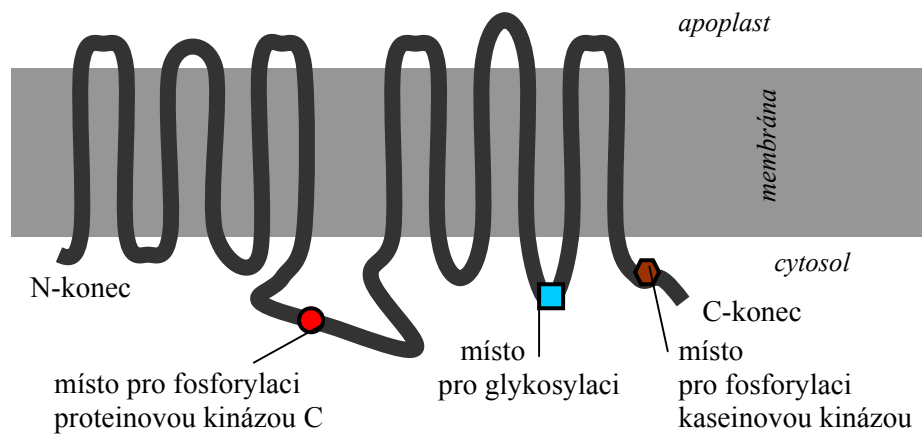
Obr. 6-4. Kalmodulin – schéma molekuly a vazba na protein.



Navázáním čtyř Ca^{2+} kalmodulin mění terciární strukturu a získává schopnost vázat se na specifické vazebné místo na proteinu. Funkce proteinu je vazbou významně modifikována.

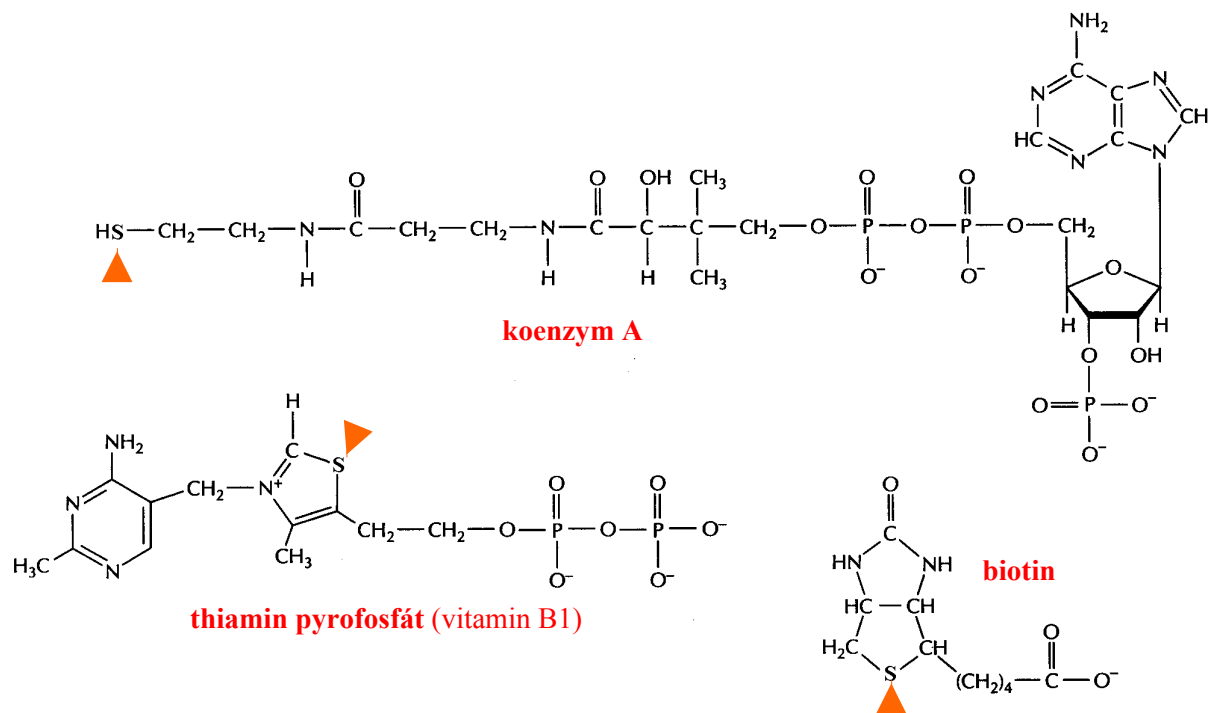
zpět do textu

Obr. 6-15. Schematicky znázorněná struktura vysokoafinitního přenašeče Pi (struktura SLS, six-loop-six) s místy regulace.



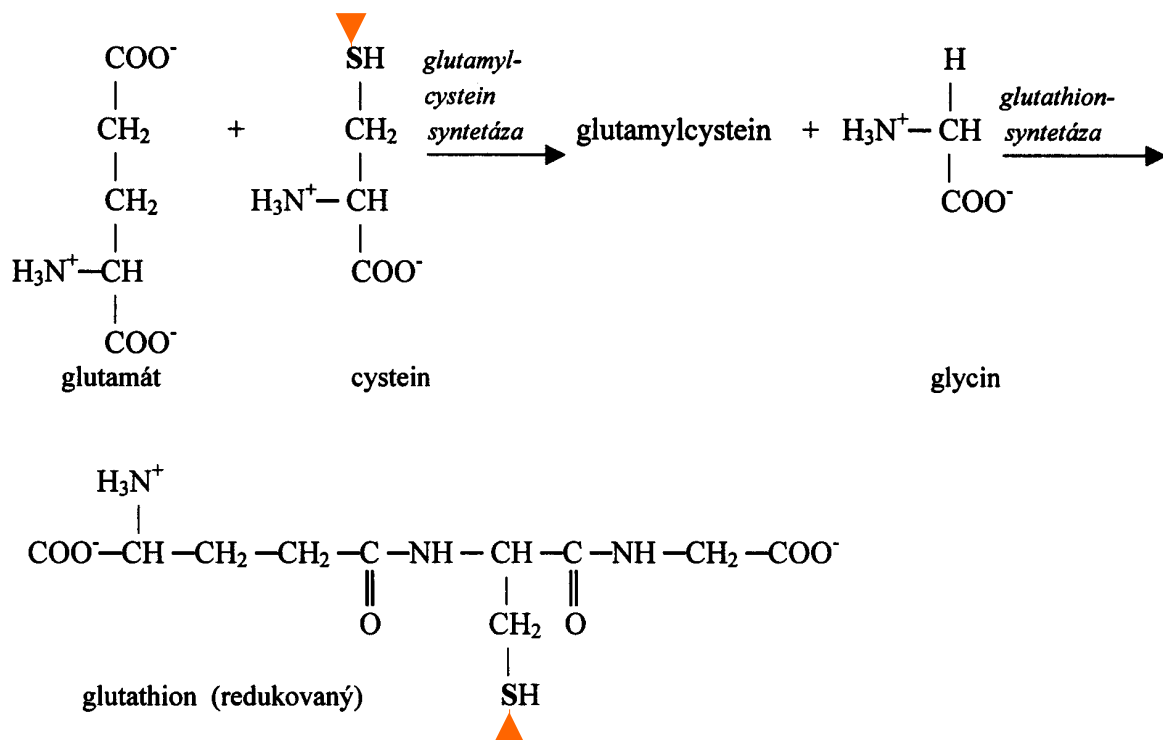
zpět do textu

Obr. 6-16. Důležité koenzymy obsahující síru.



zpět do textu

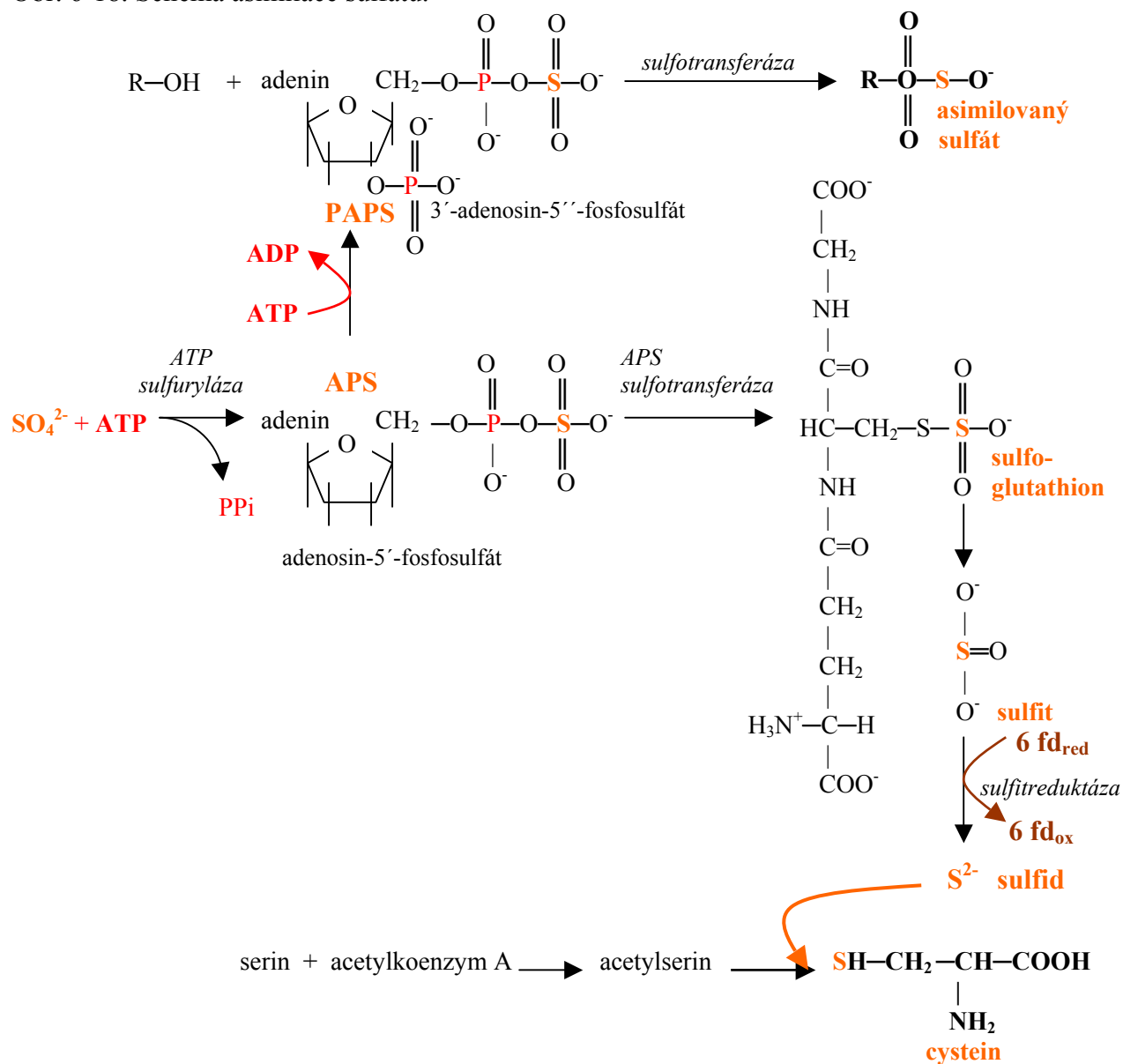
Obr. 6-17. Glutathion



Tripeptid glutathion je syntetizován příslušnými enzymy v **cytosolu**. Glutathion a příbuzné tripeptidy jsou prekurzory fytochelatinů, látek, které vážou do komplexů a tím inaktivují těžké kovy.

zpět do textu

Obr. 6-18. Schéma asimilace sulfátu.



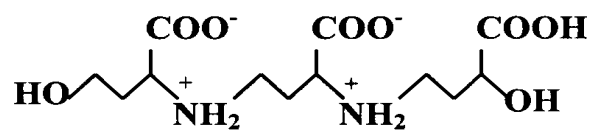
zpět do textu na str. 31

do textu na str. 32

do textu na str. 38

Asimilace síry je zahájena reakcí sulfátu s ATP, vzniká APS. Pro přímou inkorporaci sulfátu do organických látek APS reaguje s další molekulou ATP. Vzniká PAPS, látka s vysokým obsahem vnitřní energie, který je funkčním donorem sulfátové skupiny (reakce je katalyzována enzymem PAPSsulfotransferázou). Elektronů nutné k redukcí sulfátu poskytuje nejprve redukovaný glutathion, v dalších krocích ferredoxin (nelze vyloučit i účast thioredoxinu). Redukovaná síra (sulfid) reaguje s acetylserinem za vzniku cysteinu. Cystein je prekurzorem dalších látek, obsahujících redukovanou síru, např. methioninu a glutathionu. fd_{red} – redukovaný ferredoxin, fd_{ox} – oxidovaný ferredoxin

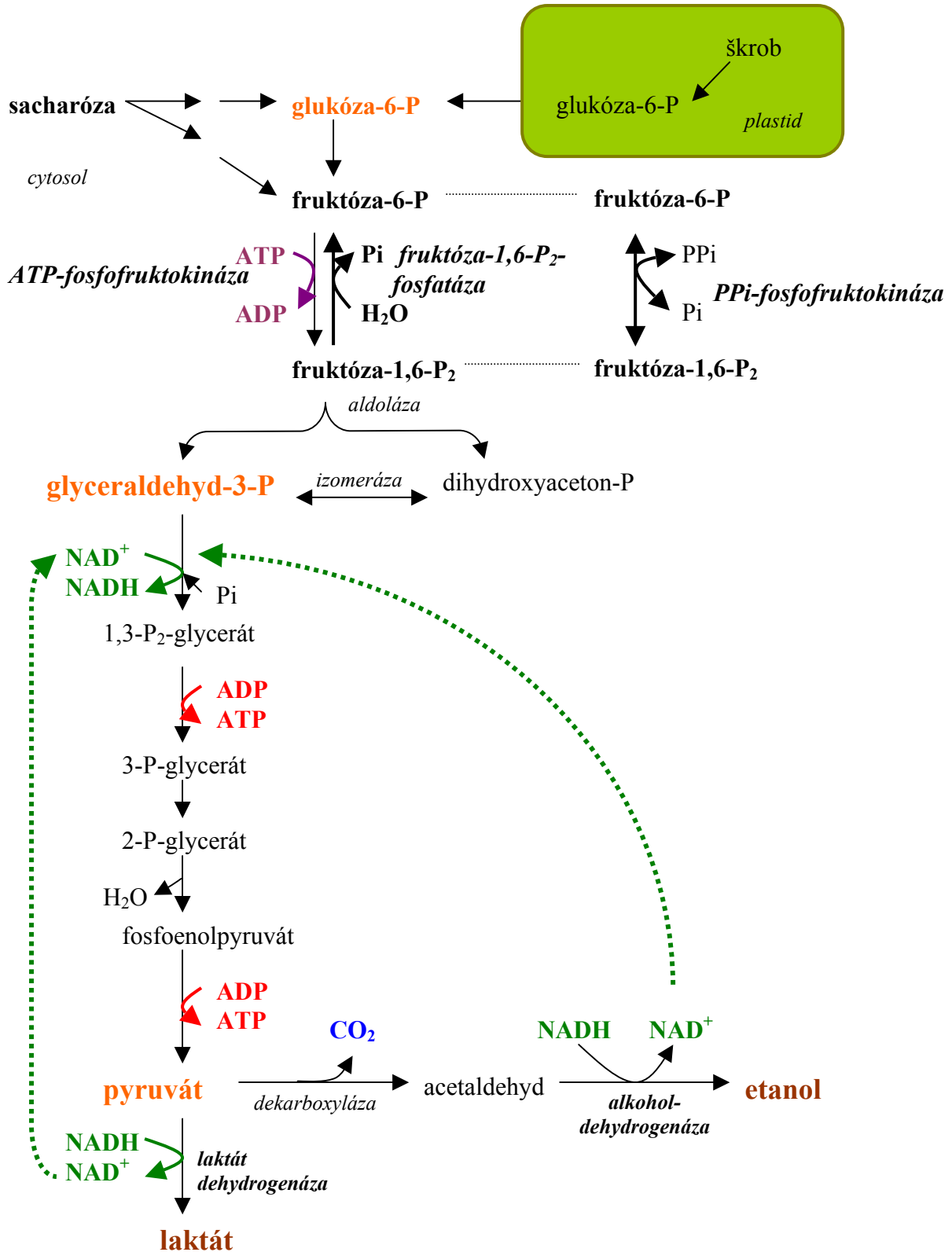
Obr. 6-19. Kyselina avenová - fytosiderofor.



Fytosiderofory (fytometalofory) jsou vylučovány do rhizosféry, tvoří komplexy s kovovými prvky a slouží k jejich transportu přes membránu do cytosolu. V cytosolu se kovový prvek z komplexu uvolní, fytosiderofor je rozložen nebo se vrací do rhizosféry.

zpět do textu

Obr. 4-1. Anaerobní glykolýza

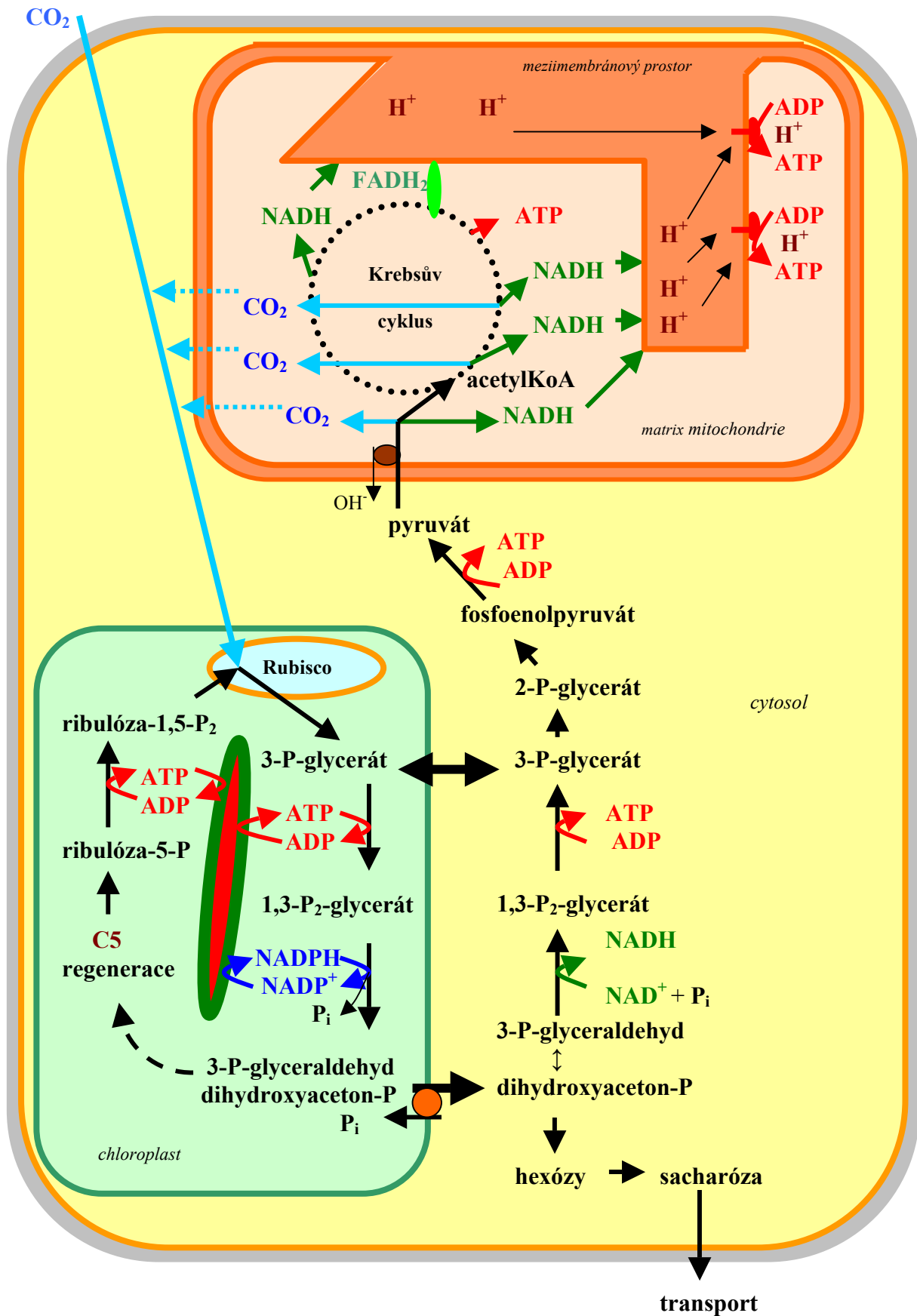


zpět na str. 28

Za aerobních podmínek je v konečné fázi respirace (elektrontransportní řetězec) akceptorem elektronu kyslík. Za anaerobních podmínek je inhibována nejen konečné fáze respirace ale i fáze předcházející, většina NADH je v redukované formě, inhibovány jsou i procesy Krebsova

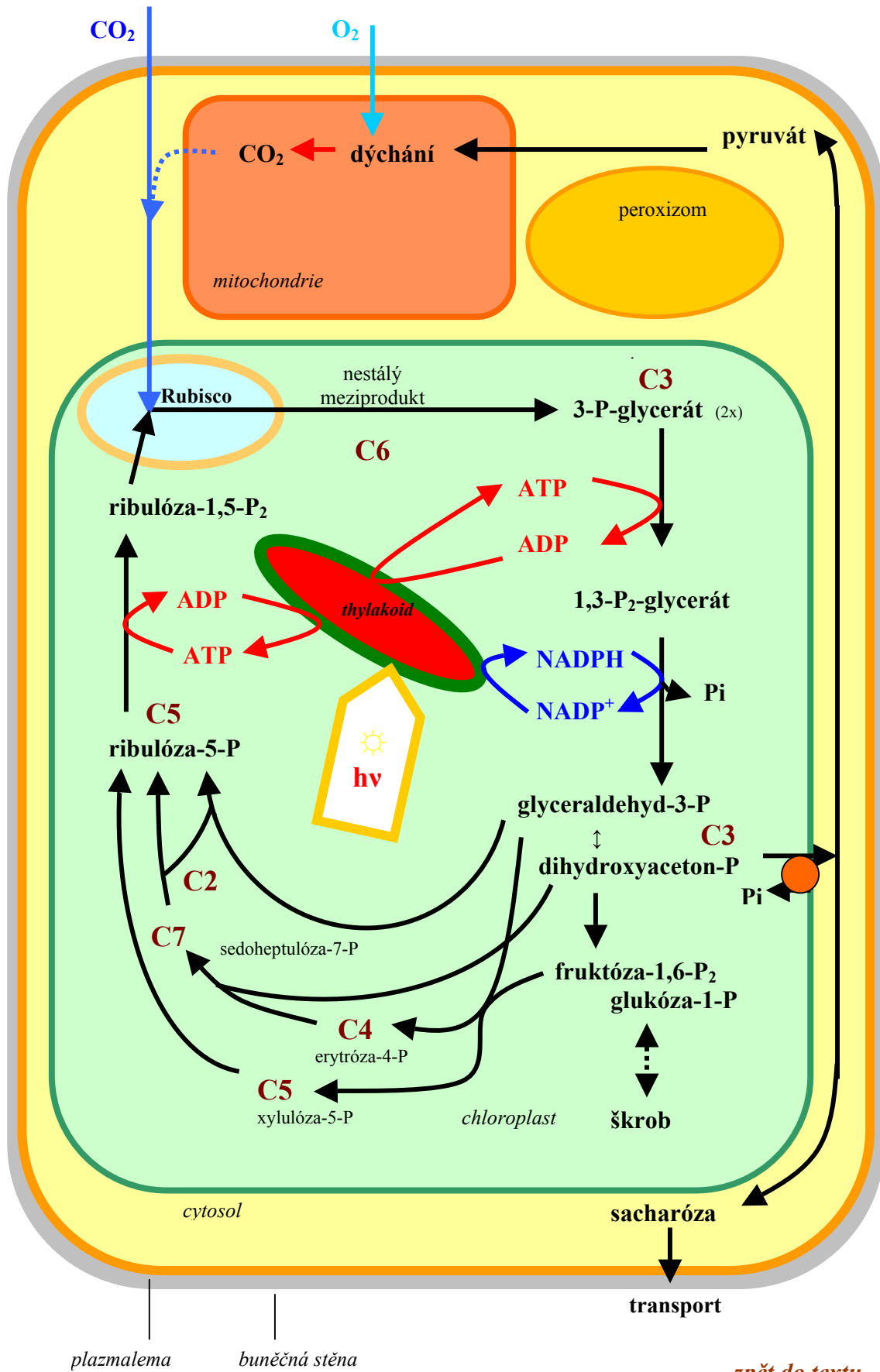
cyklu. Nedostatek NAD^+ ovlivňuje i glykolýzu. Za těchto podmínek je pyruvát metabolizován na etanol nebo na laktát. Při těchto procesech vzniká NAD^+ , který umožní oxidaci 3-P-glyceraldehydu na 1-3-P₂-glycerát a otevírá se tak cesta ke vzniku 2 ATP z glykolýzy.

Obr. 3-23. Transport energie z chloroplastu na světle.



Na světle jsou z chloroplastu transportovány fosforylované triózy (především dihydroxyacetone-P) výměnou za anorganický fosfát. V glykolýze, Krebsově cyklu a v dýchacím řetězci je z trióz získáván ATP, NADH a meziprodukty, které slouží jako substráty k syntéze dalších potřebných metabolitů. 3-P-glycerát, vznikající v glykolýze, může být z cytosolu transportován do chloroplastu a být znovu redukován (tzv. glycerátový člunek). Na delší vzdálenosti v rostlině jsou sacharidy transportovány nejčastěji ve formě sacharózy.

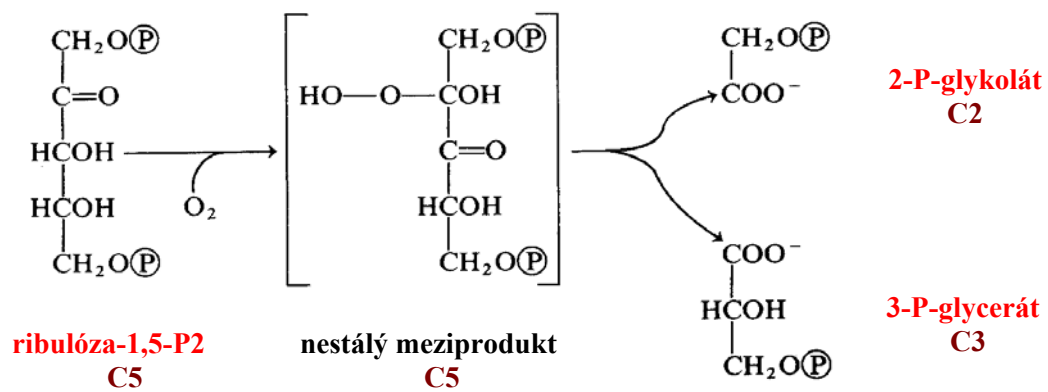
Obr. 3-23. Schéma Calvinova cyklu



[zpět do textu](#)

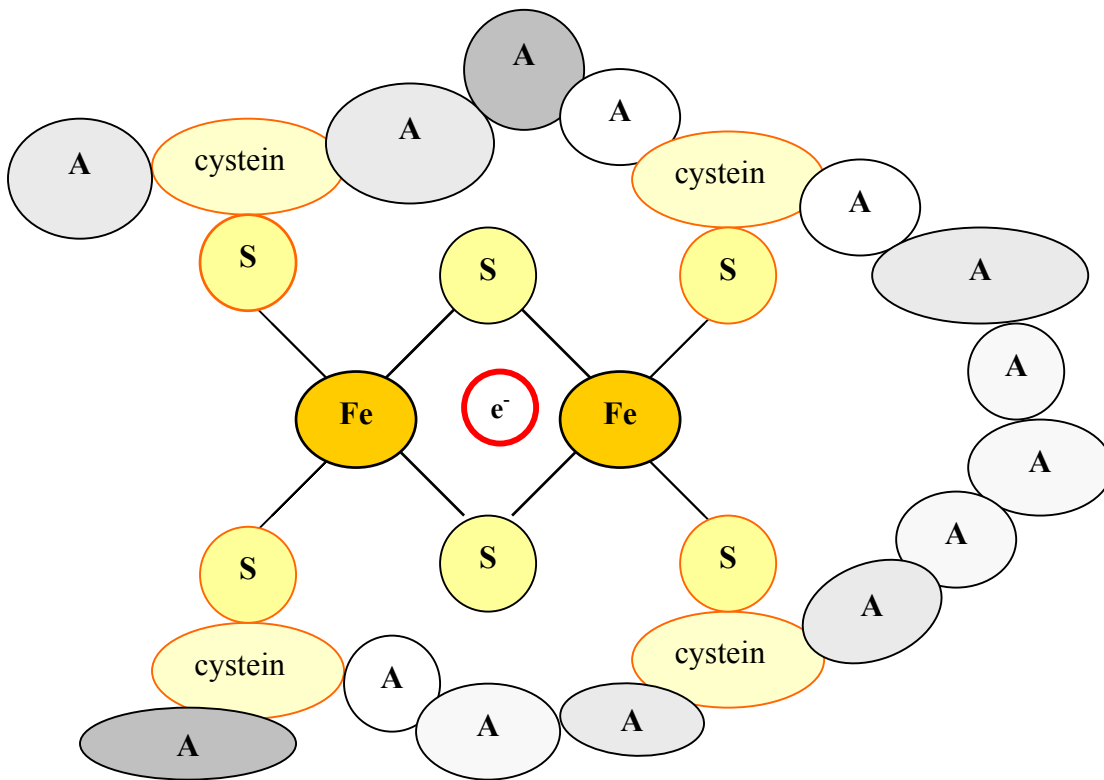
Calvinův cyklus zahrnuje několik fází. Fáze **karboxylační**: navázníá CO_2 na organický substrát ribulóza-1,5-bisfosfát (reakce je katalyzována enzymem Rubisco) a vznik 2 molekul kyseliny 3-P-glycerové. Fáze **redukční**: kyselina 3-P-glycerová je redukována na aldehyd (3-P-glyceraldehyd), spotřebovávají se produkty primární fáze fotosyntézy, ATP a NADPH. Fáze **regenerační**: z trióz se regeneruje substrát pro karboxylaci, vznikají sacharidy s různým počtem atomů C. Tyto meziprodukty mohou být využity i k syntéze jiných látek, např. škrobu. Dihydroxyaceton-P je transportován do cytoplazmy. Další podrobnosti v textu.

Obr. 3-25. Fotorespirace – vznik glykolátu.



zpět do textu

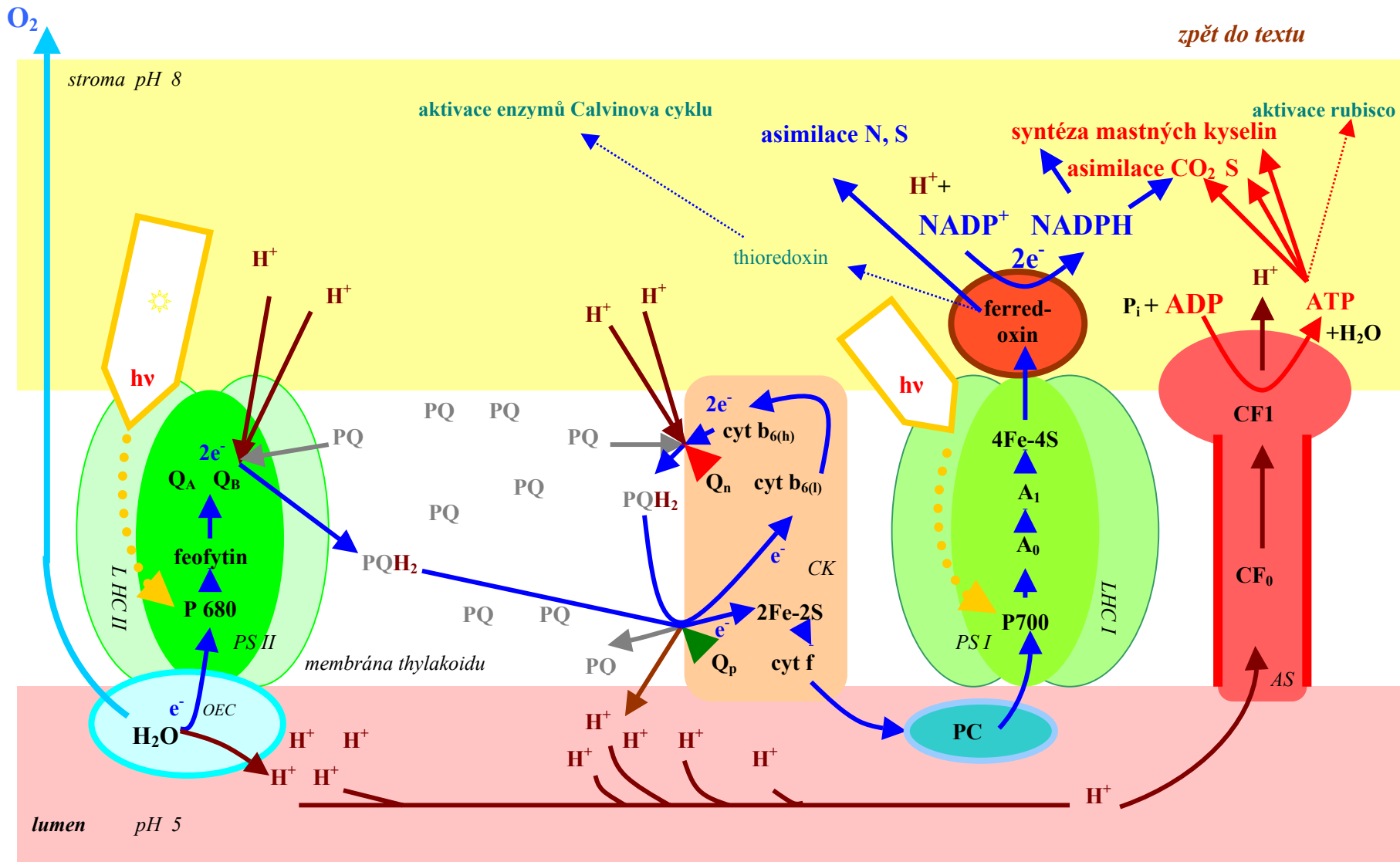
Obr. 3-8. Schéma centra Fe-S.



zpět do textu

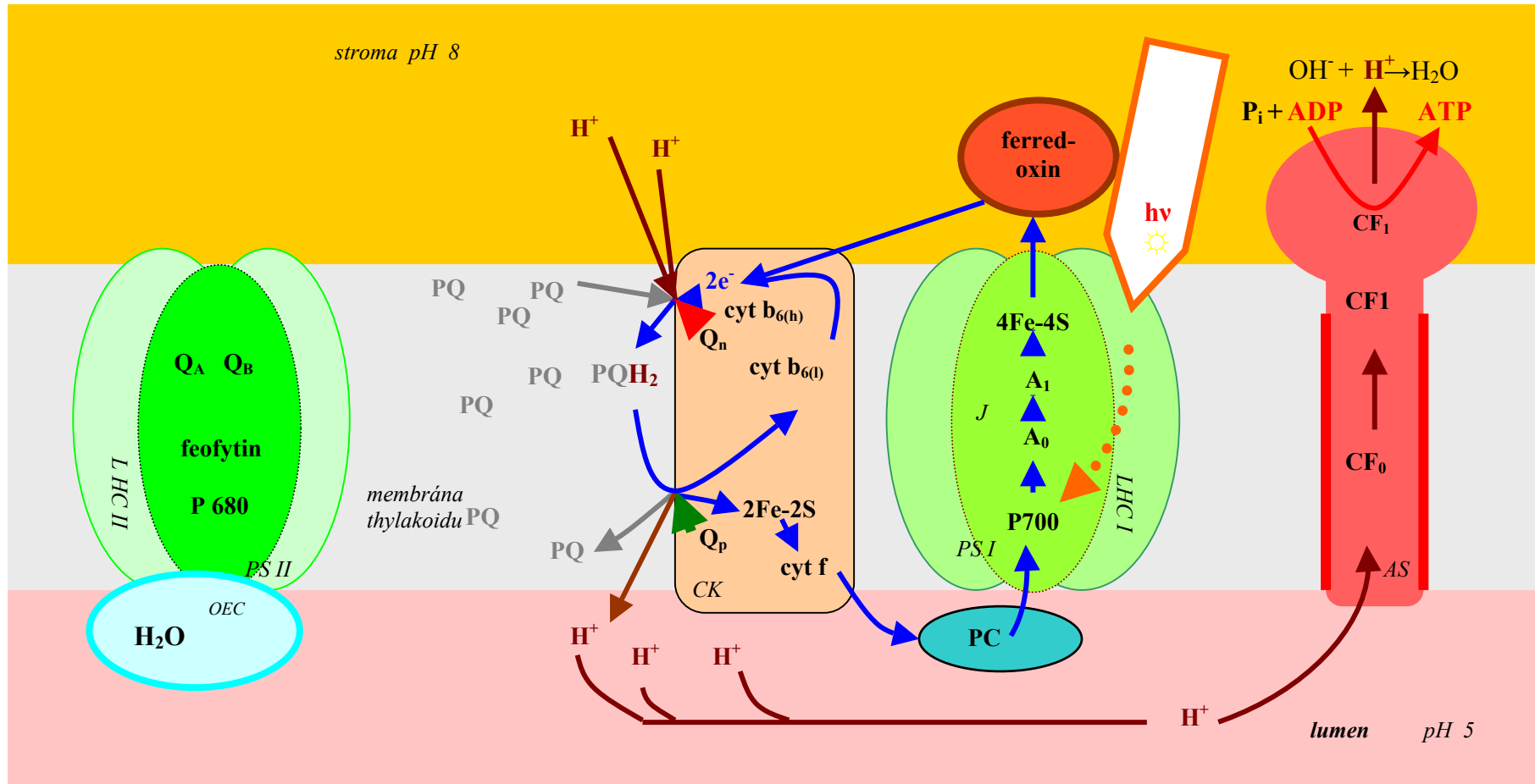
Struktura označovaná jako **Fe-S** nebo **Fe-S centrum** je schopna přenášet **elektron** a dává proteinu oxidačně redukční schopnost. Je tvořena 2 atomy Fe, které jsou vázány na protein přes čtyři atomy S v cysteinových zbytcích. Atomy Fe vážou další 2 atomy S, které nejsou součástí proteinu. V této podobě se centrum označuje jako **2Fe-2S**. Vyskytuje se nejen v **Rieskeho proteinu** ale také ve **ferredoxinech** a **thioredoxinech**. V mobilních typech ferredoxinů jsou centra tvořena 2 Fe a 2S, u ferredoxinů vázaných, např. na RCI, mohou být centra tvořena 4 Fe a 4S. A – zbytky různých aminokyselin v proteinu.

Obr. 3-11. Necyklický přenos elektronu fotosyntetickým aparátem v primární fázi fotosyntézy, produkty a jejich vztahy k dalším procesům.



PSII – fotosystém II. LHCII – světlosběrný (anténní) komplex fotosystému II. e^- - elektron. H^+ - proton. OEC – komplex rozkládající vodu a uvolňující kyslík (z angl. *oxygen evolving complex*). P680 – chlorofyl *a* s maximem absorpce 680 nm. Q_A, Q_B – chinony vázané v jádru fotosystému II. PQ – plastochinon, PQH_2 – redukovaný plastochinon. $h\nu$ – foton. CK – cytochromový komplex b_6f . cyt *f* – cytochrom *f*. cyt $b_{(l)}$ – cytochrom *b* s nízkým potenciálem, cyt $b_{(h)}$ – cytochrom *b* s vysokým potenciálem, 2Fe-2S – Rieskeho protein s centrem Fe-S. Q_p – vazebné místo pro PQH_2 (PQH_2 se zde oxiduje). Q_n – vazebné místo pro PQ (PQ se zde redukuje na PQH_2). PC – plastocyanin, protein obsahující Cu. P700 - chlorofyl *a* s maximem absorpce 700 nm. A_0 – chlorofyl *a*. A_1 – fylochinon. AS – ATP syntáza. CF_0, CF_1 – podjednotky ATPsyntázy. Další podrobnosti v textu.

Obr. 3-12. Cyklický přenos elektronu membránou thylakoidu v primární fázi fotosyntézy



zpět do textu

PSII – fotosystém II; LHCII – světlosběrný (anténní) komplex fotosystému II; e^- - elektron; H^+ - proton; OEC – komplex rozkládající vodu a uvolňující kyslík (z angl. *oxygen evolving complex*); P680 – chlorofyl a s maximem absorpce 680 nm; Q_A, Q_B – chinony vázané v jádru fotosystému II; PQ – plastochinon, PQH_2 – redukovaný plastochinon; $h\nu$ – foton; CK – cytochromový komplex b_6f ; cyt f – cytochrom f; cyt $b_{(l)}$ – cytochrom b s nízkým potenciálem, cyt $b_{(h)}$ – cytochrom b s vysokým potenciálem; 2Fe-2S – Rieskeho protein s centrem Fe-S; Q_p – vazebné místo pro PQH_2 (PQH_2 se zde oxiduje); Q_n – vazebné místo pro PQ (PQ se zde redukuje na PQH_2); PC – plastocyanin, protein obsahující Cu; PS I – fotosystém I; LHC I - světlosběrný (anténní) komplex fotosystému I; J – jádro fotosystému I; P700 - chlorofyl a s maximem absorpce 700 nm; A_0 – chlorofyl a; A_1 – fylochinon; AS – ATPsyntáza; CF_0, CF_1 – podjednotky ATPsyntázy. Další podrobnosti v textu.