

**Agrovoc descriptors:** plants; transpiration; gas exchange; physiological functions; carbon dioxide; evaporation; stomata

**Agris category code:** F40, F50, F61

COBISS koda 1.02

## Regulacija prevodnosti listnih rež

Jože HLADNIK<sup>1</sup>, Dominik VODNIK<sup>2</sup>

Prispelo: 26. januarja 2007; sprejeto 20. junija 2007

Received: January 26, 2007; accepted June 20, 2007

### IZVLEČEK

Kopenske rastline se soočajo s problemom, kako sprejeti iz ozračja ustrezno količino CO<sub>2</sub> in pri tem omejiti oddajanje vode. Rešitev tega problema je uravnavanje prevodnosti listnih rež. Da je v danih razmerah dosežena optimalna prevodnost rež, se celice zapiralke odzivajo na mnoge signale iz okolja in na signale iz rastline. V članku predstavljamo odzive listnih rež na glavne abiotske dejavnike in pri prikazu učinkov teh dejavnikov uporabimo lastne rezultate porometričnih meritev. Opisan je prenos signalov v regulaciji listnih rež, v opisu so vključene nekatere nedavne ugotovitve na tem področju.

**Ključne besede:** listne reže, prevodnost listnih rež, regulacija, signalna mreža, izmenjava plinov, transpiracija

### ABSTRACT

#### REGULATION OF STOMATAL CONDUCTIVITY

Land plants are faced with competing demands to take up CO<sub>2</sub> from the atmosphere while limiting water loss. The functional solution to this dilemma is the regulation of stomatal apertures. The guard cells of stomata respond, in order to achieve optimal conductance, to various environmental and endogenous stimuli. In this paper the effects of main abiotic factors on stomata are described and presented by original porometric data. In addition the signal transduction in the regulation of guard cells response, including recent findings related to this topic is discussed.

**Key words:** stomata, stomatal conductivity, regulation, signal network, gases exchange, transpiration

## 1 UVOD

Preproste rastline, ki vodne bilance ne uravnavajo aktivno, vodo hitro oddajajo skozi svojo površino, preko katere izmenjujejo tudi pline, ki sodelujejo v rastlinski

<sup>1</sup> uni. dipl. ing. agr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: joze.hladnik@bf.uni-lj.si

<sup>2</sup> izr. prof., dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: dominik.vodnik@bf.uni-lj.si

presnovi. Imenujemo jih poikilohidre rastline in so vezane na rastišča z visoko vlažnostjo. S prehodom rastlin na kopno je postala dostopnost vode najpogostejši omejujoči dejavnik rasti in razvoja. Rastline so v odgovor na ta selekcijski pritisk razvile tkiva in organe, ki jim omogočajo učinkovito preskrbo z vodo (korenine in prevodna tkiva) in tkiva, ki omejujejo izgubo le-te (krovnna tkiva s svojimi diferenciacijami). Kutikula na površini nadzemnih organov višjih kopenskih rastlin lahko močno omeji izgubo vode, a hkrati tudi ovira izmenjavo plinov, ki jih rastlina potrebuje ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ). Za učinkovito izmenjavo plinov in nadzorovano oddajanje vode so rastline v krovnih tkivih razvile posebne aktivno regulirane odprtine – reže (lat. stomata). Reže se lahko pojavljajo na različnih delih rastline, vendar v največjem obsegu na listih (listne reže). Izmenjava plinov skozi reže poteka z difuzijo, transportom, pri katerem je gonilna sila razlika v koncentraciji plina med atmosfero in rastlino. Koncentracijski gradient je poleg upornosti, ki jo plin srečuje na difuzijski poti, odločilen dejavnik hitrosti difuzijskega toka. Izrazimo ga lahko tudi kot razliko parcialnega tlaka vodne pare atmosfere in lista (deficit tlaka vodne pare). Poleg celičnih mehanizmov, npr. uravnavanja vodnega statusa celice s pomočjo osmoregulacije, predstavljajo reže osnovo za aktivno uravnavanje vodne bilance, ki jo poznamo pri homojohidrih rastlinah.

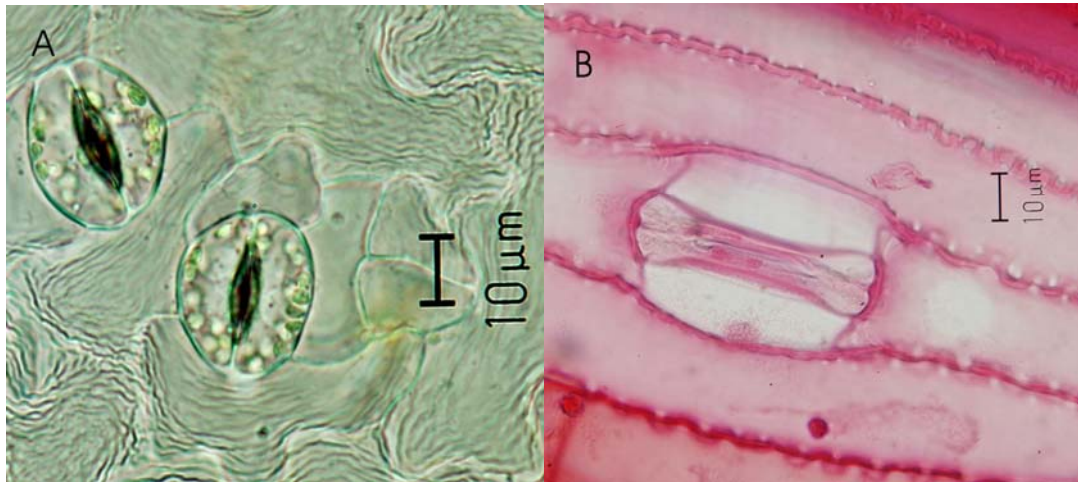
Rastlina običajno, ko ni potrebe po izmenjavi drugih plinov, omejuje izgubo vode z zapiranjem listnih rež. Večina rastlin pa mora v dnevnem času, ko v zelenih tkivih poteka fotosinteza, zagotoviti sprejem  $\text{CO}_2$  iz okoliškega zraka. Da zagotovi nemoten potek fotosinteze, rastlina odpre reže, s čimer pa se pospeši tudi proces oddajanja vode (transpiracija). Potrebno je torej kontrolirano uravnavanje prevodnosti listnih rež, ki je vedno sprejemanje kompromisa, kako zadostiti presnovnim potrebam v okviru fotosintezne vezave atmosferskega ogljika in kako hkrati s primernimi omejitvami transpiracije ohraniti pozitivno vodno bilanco rastline. Ta odnos med fotosintezo in transpiracijo opredelimo s parametrom, ki ga imenujemo učinkovitost izrabe vode (water use efficiency).

Rastline so, da je dosežena optimalna izmenjava plinov ob čim manjši izgubi vode, razvile zapleten sistem regulacije odprtosti rež. Listne reže se odzivajo na mnoge okoljske in notranje (endogene) signale, na vsakega na določen način. Različni dejavniki pa nikoli ne delujejo ločeno, temveč se njihovi vplivi prepletajo. Prav tako pa so med seboj prepletene signalne poti, preko katerih dejavniki sprožajo spremembe prevodnosti rež. Prav zapletena signalna mreža omogoča rastlinam doseganje za dane razmere optimalne odprtosti listnih rež in prej omenjenega kompromisa. V tem članku kratko predstavljamo vplive glavnih dejavnikov, ki določajo prevodnost listnih rež in dosedanja spoznanja o delovanju mrež pri prenosu signalov.

## **2 ZGRADBA LISTNIH REŽ**

Aktivni del listne reže sta dve celici zapiralki (ang.: guard cell), med katerima se nahaja odprtina. Celici zapiralki lahko spremljata celici spremljevalki ali pa sta obdani z običajnimi celicami povrhnjice (slika 1). Celice zapiralke s spremembo koncentracije osmotsko aktivnih snovi uravnavajo vsebnost vode, kar se odraža na njihovem volumnu in znotrajceličnem tlaku (turgorju, potencialu tlaka). Urejena razporeditev mikrofibril celuloze v celičnih stenah določa, v katere smeri se lahko širi celica, ko se ji poveča volumen. Pri listnih režah radialna struktura v celični steni

povzročijo, da se celici zapiralki ob povečanju turgorja razmakneta in tako oblikujeta režo. Običajno je reža polkrožna (slika 1a), pri graminejskem tipu listnih rež, ki se pojavlja pri travah in šaših, pa je bolj podolgovata (slika 1b).



**Slika 1a, b:** Mikroskopske slike listnih rež. A: Dva kompleksa listnih rež v povrhnjici ciklame (*Cyclamen persicum* Mill.). Po dve celici zapiralki sta obdani z običajnimi celicami povrhnjice. Slika je narejena na sveže odluščeni povrhnjici. B: Kompleks listne reže trave bilnice (*Festuca* sp.). Vidna je značilna oblika graminejskega tipa celic zapiralk s podolgovato listno režo med njima. Celici zapiralki sta obdani s celicama spremljevalkama (svetlo), okoli pa so podolgovate celice listne povrhnjice. Na sliki je listna povrhnjica, s katere je bilo ostalo tkivo odstranjeno s strganjem (Fotografiji: B. Turk).

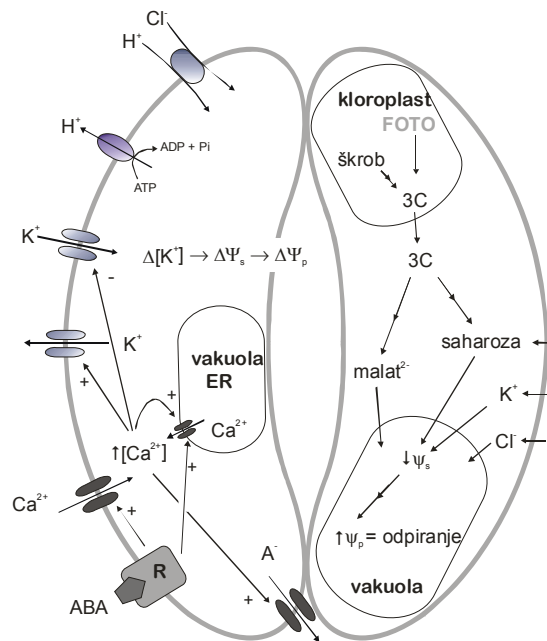
**Figure 1a, b:** Microscopic picture of stomata. A: Two stomatal complexes in cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) epidermis. Two guard cells are surrounded with epidermal cells. Picture was taken on fresh epidermal peel. B: Stomatal complex of fescue grass (*Festuca* sp.). Typical graminoid stomata with elongated guard cell can be seen. Two guard cells are accompanied with two subsidiary cells (bright). Specimen was prepared as leaf epidermal slice, lower layers of cells were removed from covering tissue by scraping (Photo: B. Turk).

### 3 MEHANIZEM DELOVANJA LISTNIH REŽ

Kot je bilo že omenjeno, listne reže uravnavajo svojo odprtost z uravnavanjem koncentracije osmotsko aktivnih snovi in posledično količine vode v celici (slika 2). Razpoložljivost vode v rastlinski fiziologiji opisujemo z vodnim potencialom ( $\psi_w$ , enota MPa), ki vključuje različne dejavnike, ki vplivajo na razpoložljivost vode v rastlini. Skupni vodni potencial  $\psi_w$  sestavljajo prispevki osmotskega potenciala ( $\psi_s$ , odvisen od količine raztopljenih snovi v vodi), potenciala tlaka ( $\psi_p$ ), gravitacijskega potenciala ( $\psi_g$ , enak potencialni energiji vode) in matričnega potenciala ( $\psi_m$ , v primerih, ko je razpoložljivost vode zmanjšana zaradi interakcij molekul vode s površino). V protoplastu rastlinske celice sta glavni komponenti vodnega potenciala negativen osmotski potencial in pozitiven potencial tlaka (turgor), običajno se skupni vodni potencial rastlinske celice giblje med -0. in -3 MPa (referenčni vodni potencial  $\psi_w = 0$  MPa ima voda brez topljencev pri okoljskem tlaku in temperaturi).

Voda bo prehajala v celico zapiralko, kadar bo njen vodni potencial manjši od vodnega potenciala v okolici. Takšno stanje je doseženo, kadar se v celici zapiralki oz. njeni vakuoli nakopičijo osmotsko aktivni topljenci, s čimer se zmanjša osmotski potencial ( $\psi_s$ ) in s tem skupni vodni potencial ( $\psi_w$ ) celice zapiralke.

Osnova za hitre spremembe osmotskega potenciala je prehajanje kalijevih ionov v celico zapiralko in iz nje (slika 2, levo). Gre za difuzijo ionov  $K^+$  skozi ionske kanalčke dveh tipov, enih za vstop  $K^+$  v celico ( $K^+_v$ ) in drugih za izhajanje  $K^+$  iz celice ( $K^+_iz$ ). Vstop  $K^+$  je možen, kadar je na membrani s pomočjo protonskih črpalk ( $H^+$ -ATPaze) ustvarjen elektrokemijski gradient, ki predstavlja energijo in signal za nadaljnje transportne procese. Hkrati z vstopom  $K^+$  v celico vstopajo tudi kloridni anioni za potrebe uravnavanja razmerja kationi/anioni v celici. Slednje se lahko uravnava tudi s pomočjo organskih anionov ( $malat^{2-}$ ), ki jih tvori celica zapiralka v presnovi ogljikovih hidratov. Presnova ogljikovih hidratov je pomembna tudi pri sintezi organskih osmotikov npr. pri nastanku osmotsko aktivne saharoze iz osmotsko neaktivnega škroba (slika 2, desno). Saharoza lahko preko dneva nadomesti  $K^+$  in vzdržuje majhen osmotski potencial in s tem velik potencial tlaka v času, ko mora biti listna reža odprta. Ob zapiranju rež se opisani dogodki vršijo v obrnjenem sledju.



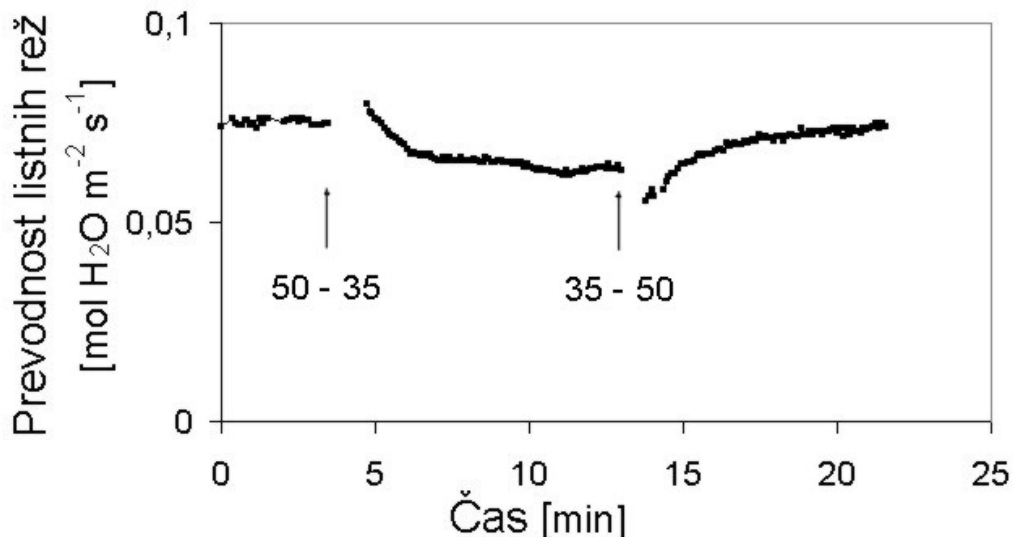
**Slika 2:** Levo: Različni membranski transportni proteini na celični membrani celic zapiralk. Delovanje kanalčkov in črpalk je ključno za spremembo količine  $K^+$  v celici, osmotskega potenciala ( $\Psi_s$ ) in s tem potenciala tlaka ( $\Psi_p$ ) v zapiralkah. Glavno osmotsko funkcijo vrši vakuola, zato so podobni transportni mehanizmi prisotni tudi na njeni membrani (tonoplastu), na sliki pa niso prikazani. V spodnjem delu leve celice je prikazana signalna vloga  $Ca^{2+}$  pri zapiranju listnih rež v odziv na ABA. Desno: Osmotsko funkcijo  $K^+$  lahko čez dan prevzame saharoza, katere izvor je škrob, neposredno fotosinteza ali pa saharoza prihaja iz sosednjih celic z aktivnim transportom. Škrob služi tudi kot vir organskih anionov ( $malat^{2-}$ ), ki uravnovežijo naboj ( $K^+$ ) v vakuoli. Isto funkcijo lahko vrši tudi kloridni anion ( $Cl^-$ ), za katerega je kotransport v celico prikazan na levi celici zgoraj. ( $A^-$  - anioni, ER - endoplazmatski retikulum,  $\Delta$  - sprememba, FOTO - fotosinteza, ABA - abscizinska kislina, R - receptor).

**Figure 2:** Left: Different transport proteins on the plasma membrane of the guard cells, e.g. channels and pumps, are crucial for the changes of potassium concentration and the consequent changes in osmotic ( $\Psi_s$ ) and pressure ( $\Psi_p$ ) potentials. The main osmotic function is performed by vacuoles, therefore similar transport mechanisms are present also on tonoplast (not shown on this figure). On the lower part of the cell we present the signal transduction mediated by changes of  $Ca^{2+}$  concentrations after ABA sensing. Right: During the day osmotic function of  $K^+$  is overtaken by sucrose. Sucrose may originate from starch degradation, from photosynthesis or may enter the cell from neighboring cells by active transport. Starch may act also as a source of organic anions ( $malate^{2-}$ ), which counterbalance cations ( $K^+$ ) in vacuoles. The same function can be performed also by  $Cl^-$ . The cotransport of  $Cl^-$  into

the guard cells is presented on the upper part of the left cell. ( $A^-$  - anions, ER - endoplazmatic reticulum,  $\Delta$  - change, FOTO - photosynthesis, ABA - abscisic acid on plasma membrane receptor)

#### 4 ODZIVI LISTNIH REŽ NA SPREMEMBE NEKATERIH ABIOTSKIH DEJAVNIKOV

Kot omenjeno je najpogostejši omejujoč dejavnik rasti in razvoja višjih kopenskih rastlin pomanjkanje vode. Regulacija odprtosti listnih rež pri odzivu na spremembo vodnega potenciala lista je v določeni meri neposredna. Ko se zniža vsebnost vode v listu, se zniža tudi vsebnost vode v celicah zapiralkah, kar pomeni, da pade turgor, zaradi česar se listne reže zaprejo. Listne reže se, s tem da po do sedaj nepojasnjem mehanizmu zaznavajo obseg transpiracije (Buckley in sod. 2005), odzivajo tudi na spremembe vodnega potenciala atmosfere. Če je okoliški zrak bolj suh se priprejo (slika 3) in tako preprečijo, da bi vsebnost vode v listu preveč padla. Pri daljšem trajajočem pomanjkanju vode je njihovo zapiranje uravnano z abscizinsko kislino (ABA), katere vsebnost v listih ob suši močno naraste.

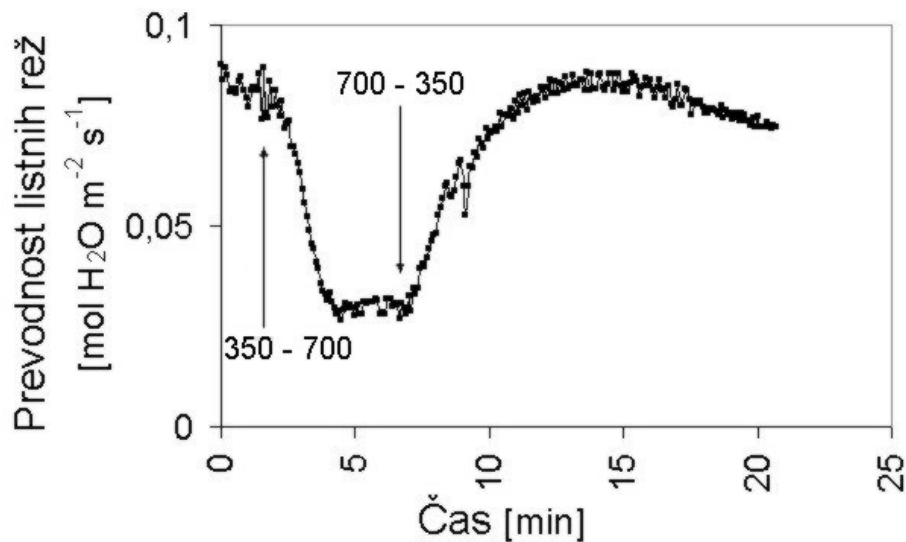


**Slika 3:** Odziv listnih rež koruze (*Zea mays* L.) na spremembo relativne vlažnosti okoliškega zraka. Puščici in spremljajoče številke označujejo čas in obseg spremembe relativne vlažnosti v %. Presledek v liniji prevodnosti listnih rež predstavlja čas, ko zaradi načina meritve ne moremo slediti odzivu listnih rež. Odziv smo merili z merilnim sistemom Li-6400 (LICOR, Lincoln, ZDA) pri 25°C, jakosti svetlobe 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ . Podatki so bili beleženi v intervalu 5 sekund.

**Figure 3:** Stomatal response of maize (*Zea mays* L.) to the changes of relative humidity. Arrows and accompanying numbers indicate time and the level [%] of relative humidity change. The breaks in the curve result from the fact that with the technique applied, it is not possible to follow stomatal conductivity shortly after the change in RH. Stomatal responses was measured with Li-6400 system (LICOR, Lincoln, USA) at 25°C, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity and 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ . Data were logged in 5 second intervals.

Na odprtost listnih rež vpliva tudi **koncentracija  $\text{CO}_2$**  ( $[\text{CO}_2]$ ). Listne reže zaznavajo  $[\text{CO}_2]$  v zraku znotraj lista ( $C_i$  - intercelularna  $[\text{CO}_2]$ ). Fotosinteza porablja  $\text{CO}_2$  v listu. Znižana  $C_i$  je signal za odpiranje listnih rež, saj si rastline z večjo prevodnostjo rež zagotovijo dovolj  $\text{CO}_2$  za fotosintezo. Ko pa  $C_i$  zadosti naraste, kar je lahko posledica zadostne odprtosti listnih rež ali pa prevlade dihanja nad fotosintezo ob pomanjkanju svetlobe, se listne reže zaprejo in s tem omejijo transpiracijo (slika 4). V poskusu prikazanem na sliki 4 smo list koruze med meritvijo izpostavili 350 oz. 700

$\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ . Ob povečanju koncentracije se je  $C_i$  spremenil iz 150 na 250  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , kar nakazuje, da rastlina uravnava  $[\text{CO}_2]$  znotraj lista. O tem, kako listne reže zaznavajo  $C_i$  in kako poteka prenos signala do odziva listnih rež, obstaja še veliko nejasnosti. Trenutno potekajo intenzivne znanstvene diskusije o pomenu fotosinteze pri zaznavanju  $C_i$  (glej točko 5; Messinger in sod., 2006; Israelsson in sod., 2006).



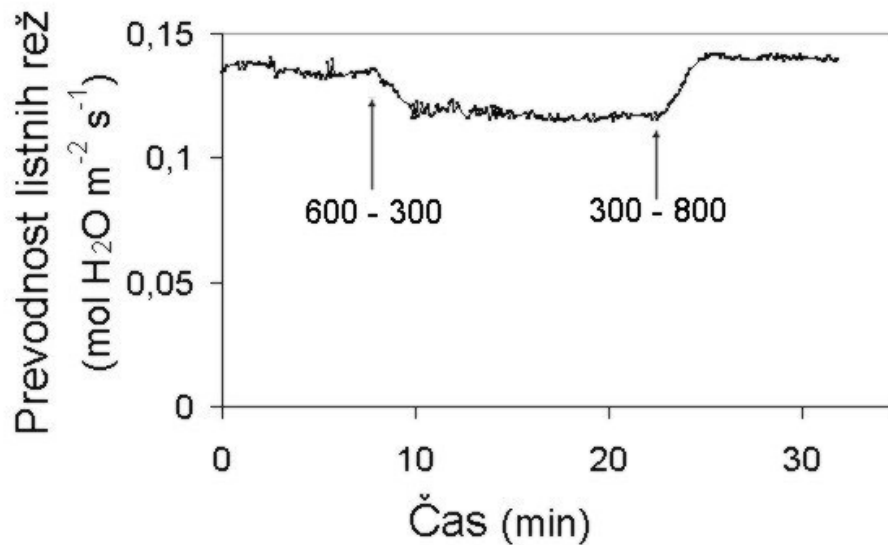
**Slika 4:** Odziv listnih rež koruze (*Zea mays* L.) na spremembo  $[\text{CO}_2]$  v okoliškem zraku. Prikazan je odziv listnih rež na spremembo  $[\text{CO}_2]$ . Puščice in spremljajoče številke označujejo čas in obseg spremembe  $[\text{CO}_2]$  v  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Odziv smo merili z merilnim sistemom Li-6400 (LICOR, Lincoln, ZDA) pri 26°C, jakosti svetlobe 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in relativni vlažnosti 35%. Podatki so bili beleženi v intervalu 5 sekund.

**Figure 4:** Stomatal response of maize (*Zea mays* L.) to the changes of  $[\text{CO}_2]$  in surrounding air. Arrows and accompanying numbers indicate time and the level  $[\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}]$  of  $\text{CO}_2$  concentration change. Stomatal response was measured with Li-6400 system (LICOR, Lincoln, USA) at 26°C, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity and relative humidity of 35%. Data were logged in 5 second intervals

Podobno kot pri  $C_i$  je tudi odziv listnih rež na **svetlobo** v določeni meri povezan s fotosintezo. Na prevodnost rež lahko vpliva tako fotosinteza znotraj lista (v mezofilu) kot fotosinteza v samih celicah zapiralkah. Svetloba v določeni meri vpliva preko porabe  $\text{CO}_2$ , kar nakazuje naša meritev, ki je prikazana na sliki 5, pri kateri je rastlina ohranila  $C_i$  skoraj nespremenjen. Obstajajo pa dokazi o neposrednem vplivu svetlobe (modra svetloba) na odprtost listnih rež.

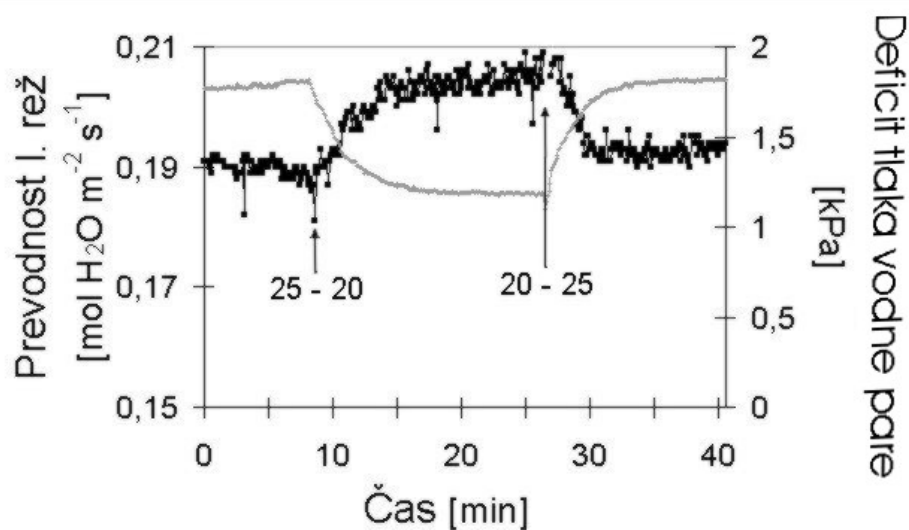
Modra svetloba vpliva na mnogo fizioloških procesov v rastlinah. Zaustavlja podaljševanje stebela, povzroča fototropizem in vpliva na izražanje genov. Prav tako modra svetloba spodbuja odpiranje listnih rež. Odkrili so tudi, da zelena svetloba deluje nasproti vplivu modre svetlobe. Če listne reže osvetlimo s pulzom modre svetlobe, zatem pa še s pulzom zelene svetlobe, ne pride do siceršnjega odziva odpiranja listnih rež (Taiz in Zeiger, 2006).

Pomemben okoljski dejavnik je tudi **temperatura**. Rastline ob nespremenjenih ostalih okoljskih vplivih nad določeno temperaturo odpirajo listne reže in se s transpiracijo hladijo. Tako povečano transpiracijo pa začnejo listne reže ponovno omejevati, ko pade vodni potencial v listu. Na sliki 6 je prikazan odziv listnih rež na spremembo temperature. Pri njem pa ob uporabljenem načinu meritve težko izločimo vpliv padca relativne vlažnosti, ki nastane ob dvigu temperature.



**Slika 5:** Odziv listnih rež koruze (*Zea mays* L.) na spremembo jakosti svetlobe. Puščici in spremljajoče številke označujejo čas in obseg spremembe jakosti svetlobe v  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Odziv smo merili z merilnim sistemom Li-6400 (LICOR, Lincoln, ZDA pri  $26^\circ\text{C}$ ,  $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  in relativni vlažnosti 35%. Podatki so bili beleženi v intervalu 5 sekund.

**Figure 5:** The stomatal response of maize (*Zea mays* L.) to changes in light intensity. Arrows and accompanying number indicate time and the level [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] of light intensity change. Stomatal responses was measured with Li-6400 system (LICOR, Lincoln, USA) at  $26^\circ\text{C}$ ,  $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  and relative humidity of 35%. Data were logged in 5 second intervals.



**Slika 6:** Odziv listnih rež osleza (*Hibiscus* sp.) na spremembo temperature (črno). Puščici in spremljajoče številke označujeta čas in obseg spremembe temperature v  $^\circ\text{C}$ . Prikazan je tudi deficit tlaka vodne pare (sivo), ki nam pove kolikšna je gonilna sila transpiracije. Ob znižanju temperature se je znižal tudi deficit vodne pare, kar bi lahko tudi vplivalo na regulacijo listnih rež (kot v poizkusu predstavljenim na sliki 3). Odziv smo merili pri  $15 \mu\text{mol H}_2\text{O mol}^{-1}$ ,  $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  in  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  svetlobe. Podatki so bili beleženi v intervalu 5 sekund.

**Figure 6:** The stomatal response of rosemallow (*Hibiscus* sp.) to temperature changes (black). Arrows and accompanying numbers indicate time and the level [ $^\circ$ ] of temperature change. The level of water vapour pressure deficit, a transpiration driving force, is also presented (in grey). By lowering the temperature water pressure deficit also decreased what can also influence stomatal regulation (similar to experiment presented on figure 2). Responses was measured with Li-6400 system (LICOR, Lincoln, USA) at  $15 \mu\text{mol H}_2\text{O mol}^{-1}$ ,  $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  and light intensity  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Data were logged in 5 second intervals.

Na odprtost listnih rež vplivajo tudi endogeni dejavniki kot so hormoni in druge molekule, ki lahko prinašajo signale iz drugih delov rastline. Med hormoni ima najpomembnejšo signalno vlogo abscizinska kislina. Izvira lahko iz različnih tkiv rastline. Ob suši nastaja v koreninah in se sprošča tudi iz celičnih rezerv v drugih tkivih npr. v listu. Ko se njena koncentracija poveča se listne reže zaprejo. Avksini na drugi strani spodbujajo odpiranje listnih rež.

## 5 PRENOS SIGNALOV

V prejšnji točki so bili na kratko predstavljeni nekateri signali, ki vplivajo na spremembe prevodnosti listnih rež. Pot od zaznave nekega abiotičnega ali biotičnega vpliva do odgovora celic zapiralk poteka preko signalnih verig, ki so sestavljene iz več signalnih dogodkov. Proučevanje prenosa signala v celicah zapiralkah je precej zapleteno, saj se signalne poti za posamezne vplive prepletajo, ob hkratnem delovanju različnih dejavnikov. Prav zapletena signalizacija pa je osnova za to, da lahko rastlina v določenih razmerah učinkovito poskrbi za primerno prevodnost listnih rež.

Brez dvoma je največ poznanega o prenosu signala abscizinske kisline (ABA), hormona, katerega koncentracija v listih ob sušnem stresu močno naraste. ABA vpliva ne samo na listne reže, ampak tudi na druge dogodke, ki so del odgovora rastlin na pomanjkanje vode. V primeru celic zapiralk so različni poskusi pokazali, da so lahko receptorji za zaznavanje abscizinske kisline tako zunajcelični, torej na plazmalemi (ABAP1, Razem in sod., 2006; slika 2), kot tudi znotrajcelični. Prvi naj bi regulirali predvsem preprečevanje odpiranja listnih rež in ekspresijo genov, drugi pa inducirali zapiranje listnih rež ter inhibirali tiste kanalčke, katerih funkcija je pomembna za odprtje reže. Prenos signala ABA v celici zapiralki poteka po več poteh, od katerih večina vključuje  $\text{Ca}^{2+}$  kot sekundarni sporočevalec. Koncentracija tega iona v citosolu ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) naraste potem, ko se zaradi ABA odprejo kanalčki za vstop  $\text{Ca}^{2+}$  v citosol iz okolice celice (apoplast) ali iz znotrajceličnih rezerv (ER, vakuola) (slika 2). Pri tem lahko kot posredniki med kompleksom ABA-receptor in kanalčki delujejo reaktivne kisikove zvrsti (ROS), inozitolfosfati, ciklična ADP-riboza, NO in druge signalne molekule (Schroeder in sod., 2001). Različni poskusi so pokazali, da povečana koncentracija  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  blokira  $\text{K}^+_v$  kanalčke, zavira delovanje protonskih črpalk ( $\text{H}^+$ -ATPaze) ter aktivira kanalčke  $\text{K}^+_{iz}$ . Skupen rezultat teh procesov pa je depolarizacija celične membrane, izstop ionov in zapiranje listnih rež. Signalizacija preko  $\text{Ca}^{2+}$  pa je še veliko bolj zapletena, kot so nakazovale prve raziskave. Ugotovili so namreč, da so za prenos signala ABA pomembna nihanja  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Takšna nihanja so prisotna tudi pri odzivu na nizko koncentracijo  $\text{CO}_2$  in avksin, ki pa oba povzročata nasproten učinek, t.j. odpiranje rež. Zelo verjetno je, da je za odgovor celice zapiralke pomembna časovna in prostorska komponenta sprememb  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  v citosolu (Roelfsema, 2005).

ABA deluje tudi po poteh, ki niso neposredno povezane s povečanjem  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Tu gre predvsem za signaliziranje, v katerem sodelujejo nekateri produkti presnove fosfolipidov in encimi fosfataze (Fan in sod. 2004).

Pri proučevanju prenosa signala svetlobe, je osnovna težava v ločevanju med neposrednimi in posrednimi (fotosintezni) vplivi svetlobe na reže. V okviru neposrednih učinkov, je največ raziskav opravljenih za modro svetlobo. Znano je, da modra svetloba na odpiranje reže vpliva z vzpodbujanjem aktivnosti protonskih



črpalk ( $H^+$ -ATPaze). Te črpalke gradijo protonski gradient, ki je osnova za sprejem  $K^+$  skozi  $K^+_v$  kanalčke in kotransport  $Cl^-$  v celico. V celicah zapiralkah naj bi bil receptor za modro svetlobo zeaksantin, pigment ksantofilnega cikla, ki sicer v kloroplastih služi za odvajanje presežne energije svetlobe. V prid tej hipotezi govorijo dejstva, I) da se absorpcijski spekter zeaksantina dobro ujema z akcijskim spektrom za odpiranje rež v odzivu na modro svetlobo; II) da ima dnevni hod koncentracij zeaksantina dobro korelacijo z dnevnim hodom jakosti osvetlitve in prevodnosti listnih rež; III) da se občutljivost rež na modro svetlobo večja s koncentracijo zeaksantina v celicah zapiralkah in IV) da je moč z blokado sinteze zeaksantina preprečiti značilen odziv rež na modro svetlobo. Hipotezo o pomenu zeaksantina pri odzivu rež lahko podkrepi dejstvo, da je moč z izomerizacijo zeaksantina razložiti pojav modro-zelene reverzibilnosti. To pa ne velja za še dva rastlinska fotoreceptorja, ki tudi zaznavata modro svetlobo (fototropin in kriptokrom) in regulirata druge procese.

Posredni učinki svetlobe na prevodnost listnih rež so v veliki meri povezani s porabo  $CO_2$  v ogljikovih reakcijah fotosinteze. Zmanjšanje  $C_i$  je močan signal za odpiranje rež. Ugotovili so, da povečana  $C_i$  aktivira počasne anionske kanalčke (S-tip), inhibira  $K^+_v$  kanalčke in aktivira  $K^+_{iz}$  kanalčke (Fan in sod., 2006), vendar je le malo poznanega o signalni poti pred odzivom ionskih kanalčkov. Povečana  $C_i$  praviloma poveča  $[Ca^{2+}]_c$  v celici, ta pa zapre listne reže, podobno kot v odzivu na ABA. Kot že omenjeno, sodeluje  $[Ca^{2+}]_c$  tudi pri odpiranju listnih rež v odzivu na nizko  $[CO_2]$ , ob kateri so opazili povečanje frekvence nihanj  $[Ca^{2+}]_c$  (Young in sod. 2006). Ob blokadi delovanja  $[Ca^{2+}]_c$  se je pokazalo, da se signal  $CO_2$  lahko prenaša tudi z mehanizmom, ki je od  $[Ca^{2+}]_c$  neodvisen. Odziv na  $[CO_2]$  bi lahko bil uravnavan preko svetlobnih reakcij fotosinteze, na kar sklepajo na podlagi sprememb prevodnosti rež, ki so jih opazili ob blokadi transporta elektronov v svetlobnih reakcijah fotosinteze (Messinger in sod., 2006). Ker svetloba in  $[CO_2]$  odločilno vplivata na razmerje med svetlobnimi in ogljikovimi reakcijami fotosinteze, je takšen način regulacije moč pričakovati za oba dejavnika.

Temperatura vpliva na skoraj vse encimske procese v celicah in s tem lahko neposredno ali posredno vpliva tudi na odprtost listnih rež. Ena od možnih razlag vpliva temperature, bi lahko bili različni temperaturni optimumi  $K^+_v$  in  $K^+_{iz}$  kanalčkov (Ilan in sod., 1995). Tako naj bi sprejem pri višjih temperaturah (nad  $20^\circ C$ ) prevladoval nad izpustom  $K^+$ , kar pomeni odpiranje listnih rež. Ta signal pa izgubi prevlado v regulaciji prevodnosti rež, ko pade vsebnost vode v listu, saj ima rastlina le omejeno sposobnost pridobivanja in prevajanja vode.

## 6 ZAKLJUČKI

V tem članku smo na kratko orisali osnovne dogodke v regulaciji prevodnosti listnih rež rastlin. Za bolj natančen pregled poznanih in predpostavljenih signalnih poti priporočamo pregledne članke kot na primer: Schroeder in sod. (2001) in Fan in sod. (2004) ali pa knjigo Plant Physiology (Taiz in Zeiger, 2006)

Najbolj raziskana je signalizacija ABA in kaže, da je tudi najbolj zapletena od predstavljenih signalov. Do sedaj so dokazali, da igra v signalni verigi odziva listnih rež na ABA pomembno vlogo vsaj deset encimov, ki tvorijo več bolj ali manj

povezanih verig. Vsaj toliko je še različnih molekul, ki opravljajo nalogo sekundarnih sporočevalcev, ter dogodkov, ki so že del odziva listnih rež na signal ABA (Li in sod. 2006). Z mutanti so odkrili tudi mnoge gene oz. njihove produkte, ki se vključujejo v regulacijo in imajo pozitiven ali pa negativen vpliv na končni odziv listnih rež. Čeprav so za vse te člene pokazali »pomembno« vlogo pri prenosu signala, je težko določiti pomen posameznega člena ali dela verige pri odzivu listnih rež. Obstaja tudi možnost, da imajo različne signalne verige v različnih rastlinskih vrstah različen pomen.

Poleg prenosa signala ABA, ki so ga poizkusili ločeno modelirati Li in sod. (2006), imamo še druge, v tem članku omenjene signale, na katerih je bilo opravljenih manj raziskav. Nekaj raziskav nakazuje, da bi lahko na odzivnost listnih rež vplivali še drugi procesi, kot na primer izgradnja in razgradnja sestavin celične stene (Jones in sod., 2003).

Ločeno raziskovanje posameznih signalov in odzivov nanje je oteženo že zaradi njihove medsebojne povezanosti. Takšen primer je tudi naš poskus prikaza odziva listnih rež na spremembo temperature (slika 6). Kljub ustaljeni absolutni vlažnosti zraka med poskusom, se ob spremembi temperature zraka spremeni relativna vlažnost zraka in s tem deficit tlaka vodne pare, ki lahko kot gonilna sila transpiracije vpliva na odziv listnih rež. S takšnim načinom meritev torej težko oddvojimo vpliv temperature od vpliva relativne vlažnosti zraka. V naravi pa je preplet posameznih signalov še toliko bolj pogost. Npr. v poletni vročini je pogosto za rastline še bolj kot visoka temperatura problem pomanjkanje vode. Ko slednje povzroči zapiranje listnih rež, pride zaradi pomanjkanja CO<sub>2</sub> do s tem povezanega zaviranja fotosinteze. Rastline pa lahko v takšnem stanju doživijo stres zaradi presežne svetlobe, ki je ne morejo koristiti v fotosinteznih reakcijah. Listne reže s pomočjo prepletenih poti združujejo vse te signale in s pomočjo zapletene regulacije v danih razmerah poskušajo vzpostaviti optimalno prevodnost listnih rež.

Obstajajo dokazi, da se odziv listnih rež aklimatizira na določen signal. Talbott in sod. (2003) so na primer ugotovili, da so se rastline, ki so rasle pri večji vlažnosti, hitreje odzivale na spremembe [CO<sub>2</sub>]. Ta odzivnost se je pokazala kot reverzibilna. Tudi nekatere naše meritve kažejo, da se listne reže na določen signal kratkoročno aklimatizirajo (Hladnik, neobjavljeni podatki). Te aklimatizacijske odzive bi lahko razložili z nastankom določene količine posameznega sekundarnega sporočevalca, ki lahko vpliva pri odzivnosti listnih rež na drug signal, ki je s tem sekundarnim sporočevalcem povezan. Na to hipotezo navaja več primerov iz literature (Talbot in sod., 2003; Li in sod., 2006; Lecourieux in sod., 2006)

V tem sestavku predstavljeni procesi ali zgolj orisane signalne sheme so večinoma že znanstveno potrjeni. Upoštevati moramo, da so te raziskave narejene na omejenem številu rastlinskih vrst (predvsem *Arabidopsis* in *Vicia faba*). Jasno je, da je regulacija listnih rež pri določenih rastlinskih vrstah precej drugačna (CAM, kserofiti), univerzalnost posameznih procesov v regulaciji listnih rež bo potrebno še raziskati. Vsekakor v prenosu signalov ostaja še mnogo nepojasnenih povezav, manjkajočih členov in nepoznanih medsebojnih vplivov. Mnoge elemente verig in njihove povezave je potrebno še empirično dokazati. Največji izziv pa ostaja določitev pomena posameznega člena v signalni mreži, ki regulira prevodnost listnih rež.

## Zahvala

Avtorja se zahvaljujeta mag. Borisu Turku za mikrografije listnih rež.

## 7 LITERATURA

- Buckley, T.N. 2005 The control of stomata by water balance. *New Phytologist*, 2, 168, 275-292.
- Fan, L.M., Zhao, Z. X. in Assmann, S. M. 2004 Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 7, 537-546.
- Ilan, N., Moran, N. in Schwartz, A. 1995 The Role of Potassium Channels in the Temperature Control of Stomatal Aperture. *Plant Physiology*, 3, 108, 1161-1170.
- Israelsson, M., Siegel, R. S., Young, J., Hashimoto, M., Iba, K. in Schroeder, J. I. 2006 Guard cell ABA and CO<sub>2</sub> signaling network updates and Ca<sup>2+</sup> sensor priming hypothesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 9, 654-663.
- Jones, L., Milne, J. L., Ashford, D. in Queen-Mason, S. J. 2003 Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20, 100, 11783-11788.
- Lecourieux, D., Raneva, R. in Pugin, A. 2006 Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, 2, 171, 249-269.
- Li, S., Assmann, S. M. in Albert, R. 2006 Predicting essential components of signal transduction networks: A dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *Plos Biology*, 10, 4, 1732-1748.
- Messinger, S.M., Buckley, T. N. in Mott, K. A. 2006 Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 2, 140, 771-778.
- Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S. R. in Hill, R. D. (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature*, 7074, 439, 290-294.
- Roelfsema, M.R. in Hedrich, R. (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist*, 3, 167, 665-691.
- Schroeder, J.I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M. in Waner, D. 2001 Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 627-658.
- Taiz L. in Zeiger E. 2006 *Plant Physiology*. 3. izdaja, Sinauer Associates, Sunderland, 705 str.
- Talbott, L.D., Rahveh, E. in Zeiger, E. 2003 Relative humidity is a key factor in the acclimation of the stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 390, 54, 2141-2147.
- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E. in Schroeder, J. I. 2006 CO<sub>2</sub> signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca<sup>2+</sup>-independent phase, and CO<sub>2</sub> insensitivity of the *gca2* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19, 103, s: 7506-7511.