

## AKTUALNE PROBLEMY BADAŃ NAD APARATAMI SZPARKOWYMI

### Recent problems of stomata investigations

Stanisław MALESZEWSKI i Bożena KOZŁOWSKA-SZERENOS

**Summary.** Current stomata investigation focuses on exo- and endogenous stimuli reception, intracellular signal transduction, metabolism and transmembrane transport connected with the guard cells movement. The function of CO<sub>2</sub> assimilation and the specific effect of the blue irradiation as well as the role of stomata in the interaction between plants and their environment are still the actual topics. Recently the attention is also paid to phenomenon of the heterogeneity in stomatal characteristics on a single leaf.

**Key words:** guard cells, stomata, blue irradiation, ABA, transpiration, photosynthesis

*Prof. dr hab. Stanisław Maleszewski, mgr Bożena Kozłowska-Szerenos, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15–950 Białystok*

#### WSTĘP

Aparaty szparkowe, całkowicie lub częściowo otwarte, umożliwiają dostęp CO<sub>2</sub> do przestrzeni międzykomórkowych miękiszu asymilacyjnego liścia. Zamykając się przeciwdziałają ujemnemu bilansowi wodnemu rośliny. Otwieranie się aparatów szparkowych u większości roślin następuje, przy odpowiednim uwodnieniu tkanek, po napromieniowaniu liści lub obniżeniu stężenia CO<sub>2</sub> w atmosferze. Regulując aktywność fotosyntetyczną i gospodarkę wodną są ważnym czynnikiem produktywności roślinnej [22, 24, 37, 45]. Wpływają w skali globalnej na sprawność wykorzystania napromieniowania i wody, a pośrednio na klimat i procesy przebiegające w glebie. Są także dogodnym obiektem w badaniach nad różnicowaniem się komórek

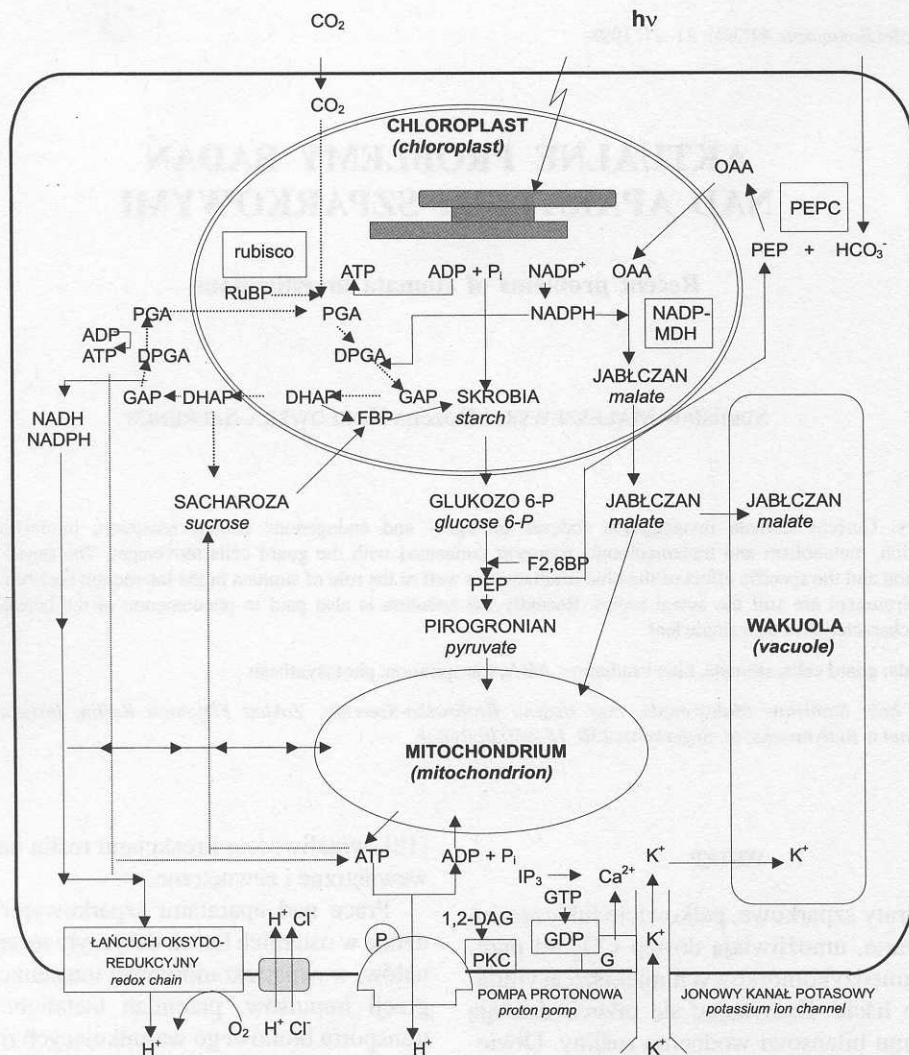
[18], wrażliwością i reakcjami roślin na bodźce wewnętrzne i zewnętrzne.

Prace nad aparatami szparkowymi prowadzone w ostatnich latach dotyczyły recepcji sygnałów, wewnątrzkomórkowej transdukcji i integracji impulsów, przemian metabolicznych i transportu błonowego warunkujących ruchy komórek szparkowych oraz udziału aparatów szparkowych w interakcjach środowisko-roślina. Stanowiły temat licznych artykułów przeglądowych [14, 21, 29, 39, 41, 47, 53, 58, 66, 80] oraz kilku międzynarodowych spotkań [20], w Lancaster (1979), na Hawajach (1983), w Berlinie (1989) i w Canterbury (1997). W *Wiadomościach Botanicznych* tematyka badań aparatów szparkowych była przedstawiona w 1988 roku [6].

---

Skróty: ABA, kwas abscysynowy; C<sub>a</sub>, zewnętrzne (atmosferyczne) stężenie CO<sub>2</sub>; C<sub>i</sub>, stężenie CO<sub>2</sub> w przestrzeniach międzykomórkowych (międzykomórkowe); PCRC, fotosyntetyczny cykl redukcji węgla (cykl C<sub>3</sub>, cykl Calvina-Bensona).

Abbreviations: ABA, abscisic acid; C<sub>a</sub>, ambient CO<sub>2</sub> concentration; C<sub>i</sub>, intercellular CO<sub>2</sub> concentration; PCRC, photosynthetic carbon reduction cycle (C<sub>3</sub> cycle, Calvin-Benson cycle).



Ryc.1. Chemiosmotyczny model indukowanego przez napromieniowanie otwierania się aparatów szparkowych (wg [66], zmienione).

Skróty i symbole: 1,2-DAG, 1,2-diacyloglicerol; DHAP, fosforan dihydroksyacetonu; DPGA, 1,3-difosfoglicerynian; FBP, fruktozo-1,6-bisfosforan; F2,6BP, fruktozo-2,6-bisfosforan; G, białko G; GAP, aldehyd-3-fosfoglicerynowy; glukozo 6-P, glukozo-6-fosforan;  $\text{IP}_3$ , inozytolo-1,4,5-trisfosforan; NADP-MDH, dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NADP; OAA, szczawooctan; P, funkcjonalna grupa fosforylowa; PEP, fosfoenolpirogronian; PEPC, karboksylaza fosfoenolpirogronianowa;  $\text{P}_i$ , nieorganiczny ortofosforan; PGA, 3-fosfoglicerynian; PKC, białkowa kinaza C; rubisco, karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu; RuBP, rybulozo-1,5-bisfosforan; linie ze strzałkami ciągłe lub przerywane przedstawiają procesy dobrze udowodnione lub wymagające potwierdzenia.

Fig. 1. Chemiosmotic model of irradiation-induced stomatal opening (after [66], modified).

Abbreviations and symbols: 1,2-DAG, 1,2-diacylglycerol; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; DPGA, 1,3-diphosphoglycerate; FBP, fructose-1,6-bisphosphate; F2,6BP, fructose-2,6-bisphosphate; G, G-protein; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; glucose 6-P, glucose-6-phosphate;  $\text{IP}_3$ , inositol-1,4,5-trisphosphate; NADP-MDH, NADP-dependent malate dehydrogenase; OAA, oxaloacetate; P, phosphoryl functional group; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase;  $\text{P}_i$ , inorganic phosphate; PGA, 3-phosphoglycerate; PKC, protein kinase C; rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; lines with arrows continuous or dashed indicate processes for which there is good evidence or which still need confirmation.

## MECHANIZM RUCHÓW

Funkcjonalną podstawą ruchów komórek szparkowych, tworzących aparat szparkowy, są zmiany ich turgoru: wzrost przy otwieraniu i spadek przy zamykaniu. Zmiany te są bezpośrednio zależne od stężenia w komórkach szparkowych kationów  $K^+$  oraz anionów jabłczanowych i  $Cl^-$  jako jonów zobojętniających (ang. counterions).

Procesy przebiegające podczas otwierania się aparatów szparkowych przedstawia schemat (Ryc. 1), który obok danych dobrze udokumentowanych uwzględnia także elementy hipotetyczne, będące obecnie przedmiotem doświadczalnej weryfikacji [66].

Po napromieniowaniu liścia promieniowaniem aktywnym fotosyntetycznie (ang. photosynthetically active radiation, PAR) otwieranie się aparatu szparkowego zapoczątkowuje wpływ protonów z komórek szparkowych, powodujący powstanie gradientu potencjału elektrochemicznego pomiędzy powierzchniami plazmolemy, wewnętrzną ujemną i zewnętrzną dodatnią. Wytworzona hiperpolaryzacja błony umożliwia wpływ do komórek szparkowych kationów  $K^+$  poprzez specyficzne kanały jonowe wprowadzające (ang. inward rectifying  $K^+$  channel). Towarzyszy temu pobieranie anionów  $Cl^-$  na zasadzie symportu  $Cl^-/H^+$  lub antyportu  $Cl^-/OH^-$  oraz synteza anionów jabłczanowych. Aniony neutralizują dodatni ładunek kationów potasu. Gromadzące się jony, głównie w wakuolach, zwiększają potencjał osmotyczny i silnie obniżają potencjał wody komórek szparkowych. Efektem jest osmotyczne pobieranie wody przez komórki szparkowe, wzrost ich turgoru i otwieranie się aparatu szparkowego [29, 53, 63, 66, 76].

Hiperpolaryzacja błon komórek szparkowych (wypływ  $H^+$ ) jest powodowana przez funkcjonujące w nich pompy protonowe zawierające  $H^+$ -ATPazy [2, 4], których substratem jest ATP produkowany w chloroplastach lub w mitochondriach. W procesie tym może uczestniczyć także zlokalizowany w błonach łańcuch oksydoredukcyjny, wykorzystujący mitochondrialny NADH lub chloroplastowy NADPH [15, 52]. Substratem dla fosforylacji mitochondrial-

nej, jak też dla syntezy jabłczanu są produkty rozkładu nagromadzonej skrobi. Jabłczan powstaje na drodze glikolizy, karboksylacji fosfoenolopirogronianu (PEP) i redukcji wytwarzanego szczawiooctanu (OAA). Dwie ostatnie reakcje katalizują: karboksylaza fosfoenolopirogronianowa i dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NADP.

W przedstawionym (Ryc. 1) chemiosmotycznym mechanizmie otwierania się aparatów szparkowych uwzględniono, w dużym stopniu jeszcze hipotetyczny, udział białka G, kinazy białkowej, jonów wapnia oraz produktów rozkładu błonowego fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu ( $PIP_2$ ), to jest inozytolo-1,4,5-trisfosforanu ( $IP_3$ ) i 1,2-diacylglicerolu (1,2-DAG). W regulacji rozkładu skrobi może też uczestniczyć fruktozo-2,6-bisfosforan (F2,6BP). Występowanie ich w komórkach roślinnych, także w komórkach szparkowych, jest dobrze udokumentowane [33, 34, 41, 69].

W doświadczeniach z *Vicia faba* L. wykazano ostatnio, że potencjał osmotyczny komórek szparkowych może zależeć również od stężenia sacharozy. Dane te [64, 65] są przedstawione w akapicie dotyczącym wpływu jakości napromienienia.

## CZYNNIKI REGULACJI

Stopień otwarcia (apertura) aparatów szparkowych zależy od szeregu czynników (bodźców, sygnałów) endogennych i środowiskowych. Głównymi są: stężenie  $CO_2$ , wilgotność środowiska i poziom kwasu abscysynowego (ABA), natężenie i jakość napromieniowania. Inne były rzadziej badane i nie są w tym artykule uwzględnione. Wydaje się też, że na oddzielne omówienie zasługuje wpływ na aparaty szparkowe zanieczyszczeń atmosferycznych [54].

## DWUTLENEK WĘGLA I TLEN

Przy braku stresu wodnego apertura aparatów szparkowych jest odwrotnie skorelowana ze stężeniem  $CO_2$  [80]. Aparaty szparkowe reagują na zmiany stężenia  $CO_2$  zarówno na świetle jak i w ciemności, co wskazuje, że dla ich reakcji na ten czynnik fotosynteza nie jest konieczna. Wy-

kazano, że bezpośrednio apertura aparatów szparkowych zależy od stężenia  $\text{CO}_2$  w przestrzeniach międzykomórkowych liścia ( $C_i$ ), a nie od stężenia  $\text{CO}_2$  w atmosferze zewnętrznej ( $C_a$ ). Aparaty szparkowe współdziałają w utrzymaniu  $C_i$  napromienionego liścia na prawie stałej wysokości. U roślin  $C_3$  jest ono w granicach 220–260 ppm (średnio około 70%  $C_a$ ), u gatunków  $C_4$  wynosi tylko około 100 ppm, natomiast u sukulentów z metabolizmem kwasowym CAM (od ang. Crassulacean Acid Metabolism) osiąga wysoką wartość ponad 400 ppm [8, 12, 23, 29, 44, 46, 77, 78, 79]. Umiarkowane podwyższenie zewnętrznego stężenia  $\text{CO}_2$ , powodujące przymknięcie się aparatów szparkowych, może nie mieć wpływu na natężenie fotosyntezy. U *Andropogon gerardii* (roślina  $C_4$ ), po dwukrotnym podwyższeniu  $C_a$ , stwierdzano natomiast istotne obniżenie transpiracji i zwiększenie współczynnika wykorzystania wody [31]. Receptory  $\text{CO}_2$  oraz metabolity uczestniczące w przekazywaniu indukowanego sygnału nie są znane [45].

Otwieranie się aparatów szparkowych w odpowiedzi na obniżone stężenie  $\text{CO}_2$ , zarówno na świetle jak i w ciemności, przebiega tylko w obecności tlenu, co uważa się za świadectwo udziału oddychania w tym procesie. Tlen może też być akceptorem elektronów dla końcowej oksydazy łańcucha oksydoredukcyjnego (Ryc. 1), zlokalizowanego w plazmolemie [66, 70, 71]. Natomiast stężenie  $\text{O}_2$  około 100% hamuje bardzo silnie otwieranie się aparatów szparkowych fasoli na świetle [43]. Mechanizm ostatniego zjawiska nie jest wyjaśniony.

#### WILGOTNOŚĆ ŚRODOWISKA I ABA

Nadrzędną funkcją aparatów szparkowych, mimo iż reagują one także na czynniki fotosyntezy (napromieniowanie,  $\text{CO}_2$ ), jest regulacja gospodarki wodnej rośliny przez ograniczanie transpiracji. W środowisku o niepełnym uwodnieniu aparaty szparkowe mają zmniejszoną aperturę, w skrajnym przypadku, np. u sukulentów z CAM, pozostają zamknięte podczas dnia. Nie wiadomo czy bezpośrednio jest to reakcja na wilgotność atmosfery, różnicę pomiędzy wilgotnością zewnętrzną i wewnętrzną atmosfery

liścia, na natężenie transpiracji, czy też na obniżoną dostępność wody dla komórek szparkowych lub całej rośliny. Są dane potwierdzające każdą z tych możliwości [13, 21, 25, 26, 29, 48, 67]. Wykazano, że u fasoli stres wodny zwiększa szybkość reakcji aparatów szparkowych na zmiany napromienienia [5]. Interesujące jest też występowanie charakterystycznej fazy przejściowej (*ang.* transient phase) w odpowiedzi aparatów szparkowych na zmniejszanie i zwiększanie wilgotności zewnętrznej atmosfery, która wyraża się krótkotrwałą, przeciwną do końcowej, zmianą ich apertury. Zjawisko to jest tłumaczone wpływem na stan i ruchy aparatów szparkowych komórek przyszparkowych, zwłaszcza bocznych [25, 26].

Rośliny w stresie wodnym, których aparaty szparkowe mają ograniczoną aperturę, wykazują podwyższony poziom ABA, co sugeruje, że apertura aparatów szparkowych może być regulowana za pośrednictwem tego hormonu [21]. Wielokrotnie stwierdzano też, że susza glebowa zwiększa przepływ ABA w roztworze przemieszczającym się z korzeni do części nadziemnych rośliny [11]. ABA dostarczany do liści może powodować więc spadek turgoru komórek szparkowych i zamykanie się aparatów szparkowych.

Mimo stwierdzanej korelacji pomiędzy stężeniem ABA w liściach a aperturą aparatów szparkowych, są wątpliwości czy mechanizm reakcji na suszę glebową jest zawsze tylko taki jak wspomniany wyżej. Uzyskano bowiem dane wskazujące, że reakcja na sygnały docierające z korzeni może zależeć od stanu uwodnienia liścia. Dystrybucja ABA w liściu i wrażliwość komórek szparkowych na ABA dopływający z korzeni może być modyfikowana przez gradient pH w tkankach liścia, rozmieszczenie i metabolizm ABA w komórkach. Rozważano także możliwość udziału w regulacji aparatów szparkowych sygnałów chemicznych innych niż ABA. Czynniki te mogłyby także przeciwdziałać zamykaniu się aparatów szparkowych w obecności ABA przy dobrym uwodnieniu liścia [19, 68].

Zamykanie się aparatów szparkowych, indukowane przez ABA (Ryc. 2), nie jest prostym odwróceniem procesów przebiegających pod-

czas ich otwierania się. Zaproponowano, że komórki szparkowe mają co najmniej dwa miejsca percepcji ABA: zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular receptor) i wewnątrzkomórkowe (ang. intracellular receptor). Pobudzenie tych receptorów przez ABA, jako pierwotny bodziec, powoduje wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie komórek szparkowych na skutek dopływu tego kationu z apoplastu oraz uwalniania z magazynów wewnątrzkomórkowych. Jony wapnia pełnią funkcję wtórnego przekaźnika sygnału w komórce. Wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie powoduje depolaryzację plazmolemy, hamowanie dopływu  $\text{K}^+$  przez kanały wprowadzające (ang. inward  $\text{K}^+$  rectifying channels) i indukuje wypływ  $\text{K}^+$  przez kanały wyprowadzające (ang. outward rectifying  $\text{K}^+$  channels), także z wakuoli. Zmianom tym towarzyszy wypływ anionów oraz konwersja jabłczanu w skrobię. Efektem końcowym jest utrata wody, spadek turgoru i zamykanie się aparatów szparkowych [41].

Kanały wyprowadzające jony  $\text{K}^+$  z komórek szparkowych, przeciwnie niż kanały wprowadzające, są niewrażliwe na wysokie stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  i są aktywowane przez depolaryzację błon. Mechanizm depolaryzacji błon przez ABA za pośrednictwem  $\text{Ca}^{2+}$  jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Może polegać na hamowaniu przez  $\text{Ca}^{2+}$  błonowych  $\text{H}^+$ -ATPaz [41].

Wzrost stężenia cytoplazmatycznego  $\text{Ca}^{2+}$  może być także wynikiem wypływu  $\text{Ca}^{2+}$  z wakuoli (Ryc. 2). Cytoplazmatyczny  $\text{Ca}^{2+}$  aktywuje bowiem tonoplastowe kanały potasowe, co prowadzi do depolaryzacji tonoplastu i aktywacji w tej błonie kanałów wapniowych. Proces ten może być wspomagany przez aktywację wakuolarniej  $\text{H}^+$ -ATPazy, alkalinizującej cytoplazmę [40, 41, 42, 56, 57, 73, 74]. Błonowe kanały jonowe, uczestniczące w ruchach komórek szparkowych, zostały dokładniej scharakteryzowane u *Vicia faba* [1, 17].

Lokalizacja receptorów ABA w komórkach szparkowych nie jest określona. Jednakże dane wskazujące na udział białka G [3] oraz inozytolo 1,4,5-trisfosforanu ( $\text{IP}_3$ ) [36] w transdukcji indukowanego sygnału sugeruje, że jednym z miejsc percepcji może być zewnętrzna powierzchnia plazmolemy komórek szparkowych [41].

W rozważaniach modelowych (Ryc. 2) brany jest pod uwagę udział w transdukcji sygnału także diacyloglicerolu (DAG) jako drugiego produktu rozpadu fosfolipidów błonowych [41].

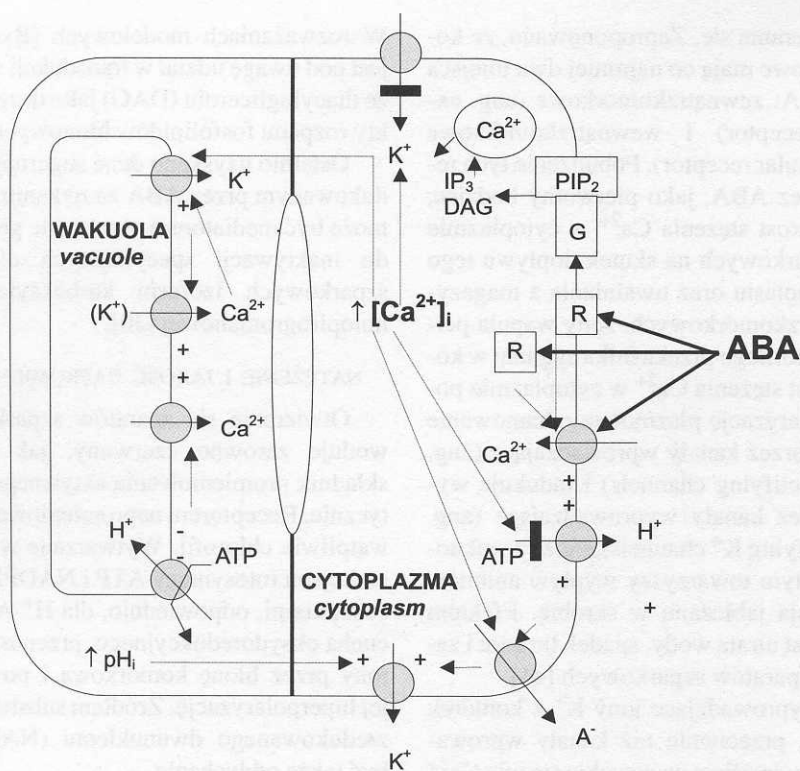
Ostatnio uzyskano dane sugerujące, że w indukowanym przez ABA zamykaniu szparek  $\text{IP}_3$  może być mediatorem w procesie prowadzącym do inaktywacji specyficznych dla komórek szparkowych izoform karboksylazy fosfoenolopirogronianowej [30].

#### NATĘŻENIE I JAKOŚĆ NAPROMIENIOWANIA

Otwieranie się aparatów szparkowych powoduje zarówno czerwony, jak i niebieski składnik promieniowania aktywnego fotosyntetycznie. Receptorem napromieniowania jest niewątpliwie chlorofil. Wytwarzane w świetlnych reakcjach fotosyntezy ATP i NADPH mogą być substratami, odpowiednio, dla  $\text{H}^+$ -ATPaz i łańcucha oksydoredukcyjnego, przenoszących protony przez błonę komórkową i powodujących jej hiperpolaryzację. Źródłem substratów, ATP i zredukowanego dwunukleotu (NADH), może być także oddychanie.

Badania wskazywały, że komórki szparkowe mogą mieć ponadto specyficzny receptor napromieniowania niebieskiego. Przypuszczano, że może nim być flawina, karotenoid lub fitochrom [29, 59, 81]. Dopiero niedawno receptor ten u *Commelina communis* zidentyfikowano jako ksantofil: zeaksantynę [86].

Napromieniowanie niebieskie, z maksimum przy długości fali około 445 nm jest bardziej aktywne niż czerwone w procesie otwierania się aparatów szparkowych [27, 28, 71, 83]. Napromieniowanie to u *Vicia faba* zwiększa wytwarzanie jabłczanu w komórkach szparkowych [49], co może być związane z aktywacją oddychania [32] oraz stymulacją aktywności karboksylazy fosfoenolopirogronianowej [58]. Doniesiono, że w liściach jęczmienia podwyższa ono zawartość ADP i ATP [7]. Wyniki badań wskazują, że napromieniowanie niebieskie może wybiórczo aktywować pompy protonowe ( $\text{H}^+$ -ATPazy), zlokalizowany w plazmolemie łańcuch oksydoredukcyjny [15, 52, 82] oraz funkcjonowanie białka G i innych procesów komórkowej transdukcji sygnałów [55].



Ryc.2. Model indukowanego przez ABA zamykania się aparatów szparkowych (wg [41], zmienione).

Skróty i symbole:  $pH_i$ , cytoplazmatyczne pH;  $PIP_2$ , fosfatidyloinozytol-4,5-bisfosforan; R, receptor ABA; linie kropkowane ze strzałkami przedstawiają mechanizmy zależne od cytoplazmatycznego  $[Ca^{2+}]_i$ ; inne jak na Ryc. 1.

Fig.2. Model of ABA-induced stomatal closure (after [41], modified).

Abbreviations and symbols:  $pH_i$ , cytosolic pH;  $PIP_2$ , phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; R, ABA receptor; dotted lines with arrows indicate mechanisms dependent on cytosolic  $[Ca^{2+}]_i$ ; the others as in Fig. 1.

Jakość napromieniowania może wpływać na charakter osmotocum warunkującego turgor komórek szparkowych [64, 65]. Otwieranie się aparatów szparkowych grochu powodowane przez napromieniowanie czerwone było bowiem związane z wrażliwym na DCMU, a więc zależnym od fotosyntezy, gromadzeniem się sacharozy w komórkach szparkowych. Równocześnie nie stwierdzano akumulacji  $K^+$  oraz rozkładu nagromadzonej skrobi. Otwieranie się aparatów szparkowych pod wpływem napromieniowania niebieskiego było natomiast związane z przejściowym pobieraniem  $K^+$  (aktywacją pomp protonowych) oraz rozkładem skrobi i syntezą jabłczanu. Później dopiero następowała akumulacja sacharozy. Prawdopodobnie więc

osmoregulacja komórek szparkowych może przebiegać dwoma drogami: transportu  $K^+$  lub/i metabolizmu sacharozy. Udział tych dróg może zmieniać się w dziennym cyklu świetlnym. Na początku dnia otwieranie się aparatów szparkowych jest zależne od transportu  $K^+$ , a w mniejszym stopniu rozkładu sacharozy. W dalszym okresie dnia, gdy aparaty szparkowe osiągną największą aperturę, zawartość potasu maleje, a sacharoza staje się dominującym osmotocum. Pochodzenie sacharozy, gromadzącej się w napromieniowanych komórkach szparkowych nie jest wyjaśnione. Możliwe są trzy jej źródła: fotosyntetyczna asymilacja  $CO_2$ , degradacja skrobi, import sacharozy z apoplastu. Dostępne dane sugerują, że każde z nich może funkcjono-

wać w odpowiednich warunkach [64, 65]. Wydaje się, że dane dotyczące udziału sacharozy w mechanizmie ruchów komórek szparkowych wiążą się też z wynikami badań, które wskazywały na udział mezofilu w tym procesie [35]. Sacharoza może być bowiem produktem transportowanym z komórek mezofilu do komórek szparkowych.

Ostatnio wykazano, że wpływ protonów z protoplastów komórek szparkowych, zależny od napromienienia niebieskiego, jest częściowo hamowany przez ABA. Efekt ten może być spowodowany bezpośrednim działaniem ABA na błonowe  $H^+$ -ATPazy lub hamowaniem transdukcji impulsu indukowanego przez napromienianie niebieskie [16]. Natomiast verapamil, inhibitor blokujący powolne (ang. slow-operated) typy kanałów wapniowych, hamuje reakcje aparatów szparkowych na napromienianie niebieskie, działając bezpośrednio na transdukcję sygnału przebiegającą z udziałem  $Ca^{2+}$  [62].

Wzmoczona wrażliwość aparatów szparkowych na napromienianie niebieskie może mieć istotne znaczenie w środowisku naturalnym, pozwalając na bardziej efektywne wykorzystanie napromienienia rano i wieczorem, oraz liści w niższych warstwach zbiorowisk roślinnych [82, 84, 85]. W słabym promieniowaniu rozproszonym, nie pochodzącym bezpośrednio od Słońca, zwiększony jest bowiem udział składnika niebieskiego [9].

#### AKTYWNOŚĆ FOTOSYNTETYCZNA

Od dawna toczy się spór o funkcjonowanie w chloroplastach komórek szparkowych cyklu fotosyntetycznej asymilacji i redukcji  $CO_2$  (PCRC, cyklu Calvina-Bensona). W licznych badaniach nie wykrywano aktywności PCRC w komórkach szparkowych, w innych aktywność ta, przeliczona na zawartość chlorofilu, stanowiła tylko kilka procent aktywności stwierdzanej w komórkach mezofilu. Ponieważ komórki szparkowe zawierają około 30 razy mniej chlorofilu niż komórki mezofilu, ich ogólna aktywność fotosyntetyczna może stanowić zaledwie około 0,1–0,2 procenta aktywności tych drugich. W badaniach aktywności fotosyntetycznej komór-

rek szparkowych stosowano preparaty epidermy zdejmowanej z liści. Nie można więc wykluczyć, że nawet ta niska aktywność fotosyntetyczna, przypisywana komórkom szparkowym, może być spowodowana obecnością komórek mezofilu w badanych preparatach epidermy [50]. Obecnie dominuje pogląd, że jeśli nawet fotosyntetyczna asymilacja i przemiany węgla przebiegają w komórkach szparkowych, to jednak ilościowy ich udział w ogólnym metabolizmie węgla liścia jest nikły. Własna fotosynteza jako ewentualne źródło osmoticum dla komórek szparkowych byłaby więc mało znacząca.

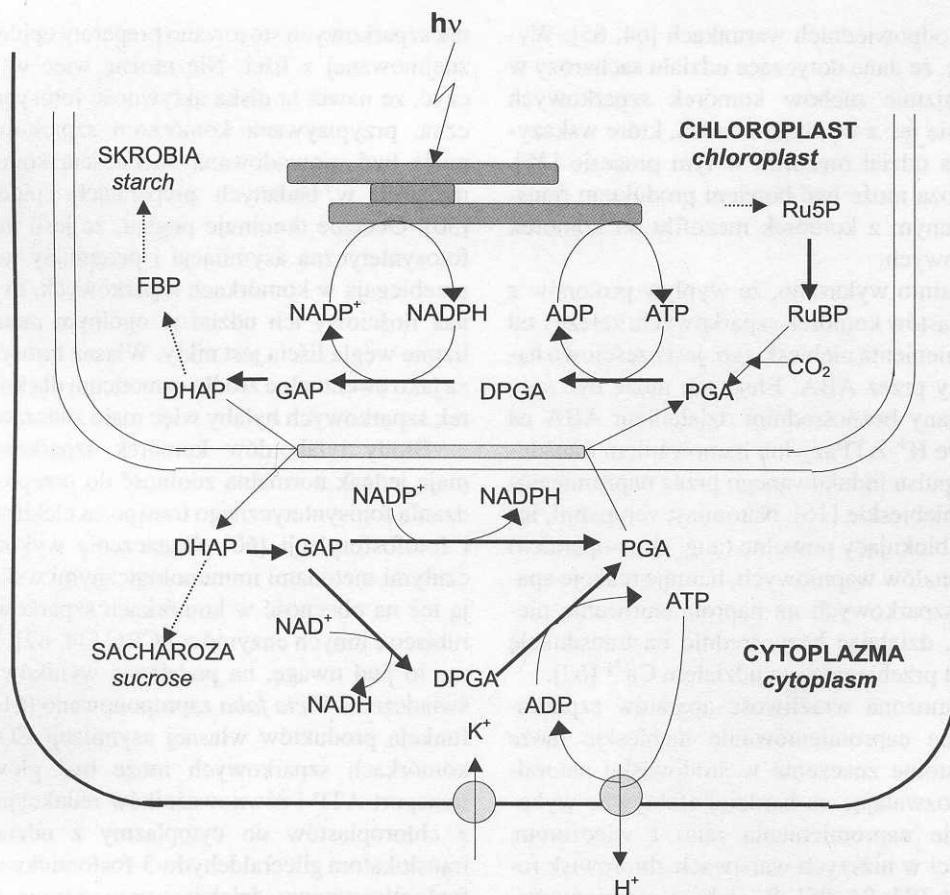
Błony tylakoidów komórek szparkowych mają jednak normalną zdolność do przeprowadzania fotosyntetycznego transportu elektronów i fotofosforylacji [60]. Oznaczenia wykonane czułymi metodami immunologicznymi wskazują też na obecność w komórkach szparkowych rubisco i innych enzymów PCRC [38, 87]. Biorąc to pod uwagę, na podstawie wyników doświadczeń z *Vicia faba* zaproponowano [61], że funkcją produktów własnej asymilacji  $CO_2$  w komórkach szparkowych może być głównie transport ATP i równoważników redukcyjnych z chloroplastów do cytoplazmy z udziałem translokatora gliceraldehydo-3-fosforan/kwas 3-fosfoglicerynowy, działającego w otocze chloroplastów (Ryc. 3). Stosując odpowiednie inhibitory wykazano też, że aktywności rubisco i innych enzymów PCRC w komórkach szparkowych jest korzystna dla procesu otwierania się aparatów szparkowych [51].

Asymilacja nieorganicznego węgla ( $HCO_3^-$ ) w komórkach szparkowych następuje jednak głównie na drodze  $\beta$ -karboksylacji PEP. Obecność w komórkach szparkowych enzymu katalizującego tę reakcję, karboksylazy PEP, jest ogólnie akceptowana. Prawdopodobnie uczestniczy on (Ryc. 1) w przekształcaniu w napromienianym liściu nagromadzonej skrobi w jabłczan [51, 66].

#### ZRÓŻNICOWANIE STANU I WRAŻLIWOŚCI

Aktualny obraz funkcjonowania aparatów szparkowych nie jest pełny i niewątpliwie jeszcze długo będzie modyfikowany i uzupełniany.





Ryc. 3. Proponowana rola fotosyntetycznej asymilacji  $\text{CO}_2$  w otwieraniu się aparatów szparkowych (wg [61], zmienione). Skróty i symbole: PCRC, fotosyntetyczny cykl redukcji węgla; obszar zakropkowany na wewnętrznej błonie otoczki chloroplastu przedstawia translokator fosforanów; pogrubione linie ze strzałkami oznaczają reakcje, których duże aktywności stwierdzono w komórkach szparkowych u *Vicia faba*; inne jak na Ryc. 1.

Fig. 3. Proposed role of photosynthetic  $\text{CO}_2$  assimilation during opening of stomata (after [61], modified).

Abbreviations and symbols: PCRC, photosynthetic carbon reduction cycle; screened area on internal membrane of chloroplast envelop presents phosphate translocator; the bold lines indicate reactions whose high activities were shown in *Vicia faba* guard cells; the others as in Fig. 1.

Interpretując dane, często sprzeczne, trzeba brać pod uwagę różnorodność stosowanego materiału roślinnego, technik i warunków badawczych. Ponadto w ostatniej dekadzie zwrócono uwagę na, stwierdzone jeszcze przez Franciszka Darwina w 1898 roku [10], zróżnicowanie stanu i reakcji (ang. heterogeneity lub patchiness) aparatów szparkowych na liściu znajdującym się w pozornie jednorodnych warunkach. Obszary o różnym stopniu otwarcia aparatów szparkowych

i odmiennych ich reakcjach mogą tworzyć na powierzchni liścia bardzo skonstrastowaną mozaikę [39, 47, 75]. Na razie brak jest podstaw dla szerszej dyskusji tego zjawiska. Jeśli okaże się, że występuje ono powszechnie, zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i naturalnych, będzie niewątpliwie przedmiotem intensywnych badań, które mogą doprowadzić do konieczności weryfikacji niektórych poglądów na funkcjonowanie aparatów szparkowych.



## LITERATURA

- [1] ALLEN G. J., AMTMANN A., SANDERS D. 1998. Calcium-dependent and calcium-independent  $K^+$  mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. *J. Exp. Bot.* **49**: 305–318.
- [2] AMODEO G., SRIVASTAVA A., ZEIGER E. 1992. Vanadate inhibits blue-light stimulated swelling of *Vicia faba* guard cell protoplast. *Plant Physiol.* **100**: 1567–1570.
- [3] ASSMANN S. M. 1996. Guard cell G proteins. *Trends Plant Sci.* **3**: 73–74.
- [4] ASSMANN S. M., SIMONCINI L., SCHROEDER J. I. 1985. Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**: 285–287.
- [5] BARRADAS V. L., JONES H. G., CLARK J. A. 1994. Stomatal responses to changing irradiance in *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* **45**: 931–936.
- [6] BIAŁCZYK J., LECHOWSKI Z. 1988. Fizjologiczne i biochemiczne aspekty ruchu aparatów szparkowych. *Wiad. Bot.* **32** (3): 13–156.
- [7] BUKHOW N. G., BONDER W. W., DROZDOWSKA I. S. 1995. Longterm effects of blue or red light on ATP and ADP contents in primary barley leaves. *Planta* **196**: 211–216.
- [8] COCKBURN W., TING I. P., STERNBERG L. O. 1979. Relationships between stomatal behaviour and internal carbon dioxide concentration in crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **63**, 1029–1032.
- [9] CZARNOWSKI M. 1993. Application of spectroradiometry in plant ecophysiology. *Wiad. Bot.* **37** (1/2): 59–72.
- [10] DARWIN F. 1898. Observations on stomata. *Phil. Trans. Royal Soc.* **190**: 531–621.
- [11] DAVIES W. J., ZHANG J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 55–76.
- [12] DRAKE B. G., GONZÁLES-MELER M. 1997. More efficient plants: Consequence of rising atmospheric  $CO_2$ ? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 609–639.
- [13] EL-SHARKAWY M. A., COCK J. H. 1986. The humidity factor in stomatal control and its effect on crop productivity. W: R. MARCELLE, H. CLIJSTERS, M. VAN POUCKE (red.), *Biological control of photosynthesis*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, s. 187–198.
- [14] FARQUHAR G. D., SHARKEY D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 317–345.
- [15] GAUTIER H., VAVASSEUR A., LASCEVE G., BOUDET A. M. 1992. Redox processes in the blue light response of guard cell protoplasts of *Commelina communis* L. *Plant Physiol.* **98**: 34–38.
- [16] GOH C. H., KINOSHITA T., OKU T., SHIMAZAKI K. 1996. Inhibition of blue light-dependent  $H^+$  pumping by abscisic acid in *Vicia* guard-cell protoplasts. *Plant Physiol.* **111**: 433–440.
- [17] GRABOV A., BLATT M. R. 1998. Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. *J. Exp. Bot.* **49**: 351–360.
- [18] HALL R. D. 1998. Biotechnological applications for stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* **49**: 369–375.
- [19] HARTUNG W., WILKINSON S., DAVIES W. J. 1998. Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *J. Exp. Bot.* **49**: 361–367.
- [20] HETHERINGTON A., DAVIES B., 1998. Stomatal biology. Preface. *J. Exp. Bot.* **49** (Special Issue): ii.
- [21] HINCKLY T. M., BRAATNE J. H. 1994. Stomata. W: R. WILKINSON (red.), *Plant-Environment Interaction*. Marcel Dekker Inc, New York, s. 323–355.
- [22] JARVIS A. J., DAVIES W. J. 1998. The coupled response of stomatal conductance to photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* **49**: 399–406.
- [23] JEWER P. C., NEALES T. F., INCOLL L. D. 1985. Stomatal responses to carbon dioxide of isolated epidermis from a  $C_3$  plant, the *Argenteum* mutant of *Pisum sativum* L., and crassulacean-acid – metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perr. *Planta* **164**: 495–500.
- [24] JONES H. G. 1998. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* **49**: 387–398.
- [25] KAPPEN L., HAEGER S. 1991. Stomatal responses of *Tradescantia albiflora* to changing air humidity in light and in darkness. *J. Exp. Bot.* **42** (241): 979–986.
- [26] KAPPEN L., SCHULTZ G., VENSELOW R. 1994. Direct observations of stomatal movements. W: E. D. SCHULZE, M. M. CALDWELL (red.), *Ecological studies* **100**, *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, s. 231–246.
- [27] KARLSSON E. 1986. Blue light regulation of stomata in wheat seedlings. II. Action spectrum and search for action dichroism. *Physiol. Plant.* **66**: 207–210.
- [28] KARLSSON P. E., ASSMANN S. M. 1990. Rapid and specific modulation of stomatal conductance by blue light in Ivy (*Hedera helix*). An approach to assess the stomatal limitation of carbon assimilation. *Plant Physiol.* **94**: 440–447.
- [29] KEARNS E. V., ASSMANN S. M. 1993. Update on guard cells. The guard cell-environment connection. *Plant Physiol.* **102**: 711–715.
- [30] KLOCKENBRING T., MEINHARD M., SCHNABL H. 1998. The stomatal phosphoenolpyruvate carboxylase – a potential target for selective proteolysis during stomatal closure? *J. Plant Physiol.* **152**: 222–229.
- [31] KNAPP A. K., FAHNSTOCK J. T., OWENBY C. E. 1994. Elevated atmospheric  $CO_2$  alters stomatal responses to variable sunlight in  $C_4$  grass. *Plant Cell Environ.* **17**: 189–195.
- [32] KOWALLIK W. 1967. Action spectrum for enhancement of endogenous respiration by light in *Chlorella*. *Plant Physiol.* **42**: 672–676.
- [33] KUBOWICZ D., JANKIEWICZ L. S. 1997. Regulacja gospodarki wapniowej – możliwy mechanizm kontroli wzrostu przez regulatory roślinne. W: L. JANKIEWICZ (red.), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*. PWN, Warszawa, s. 236–249.
- [34] LECKIE C. P., MCAINSH M. R., MONTGOMERY L., PRIESTLEY A. J., STAXEN I., WEBB A. A. R., HETHERINGTON

- A. M. 1998. Second messengers in guard cells. *J. Exp. Bot.* **49**: 339–349.
- [35] LEE Y. S., BOWLING D. J. F. (1995). Influence of the mesophyll on stomata opening. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**: 357–363.
- [36] LEE Y. S., CHOI Y. B., SUH S., LEE J., ASSMANN S. M., JOE C. O., KELLEHER J. F., CRAIN R. C. 1996. Absciscic acid induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol.* **110**: 987–996.
- [37] LU Z. M., PERCY R. G., QUALSET C. O., ZEIGER E. 1998. Stomatal conductance predicts yields in irrigated *Pima cotton* and bread wheat grown at high temperatures. *J. Exp. Bot.* **49**: 453–460.
- [38] MADHAVAN S., SMITH B. N. 1982. Localization of ribulose biphosphate carboxylase in the guard cells by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiol.* **69**: 273–277.
- [39] MANSFIELD T. A., HETHERINGTON A. M., ATKINSON C. J. 1990. Some current aspects of stomatal physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 55–75.
- [40] MCAINSH M. R., BROWNEE C., HETHERINGTON A. M. 1990. Absciscic acid-induced elevation of guard cell cytosolic  $Ca^{2+}$  precedes stomatal closure. *Nature* **343**: 186–188.
- [41] MCAINSH M. R., BROWNEE C., HETHERINGTON A. M. 1997. Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol. Plant.* **100**: 16–29.
- [42] MCAINSH M. R., CLAYTON H., MANSFIELD T. A., HETHERINGTON A. M. 1996. Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol.* **111**: 1031–1042.
- [43] MIKULSKA M., MALESZEWSKI S. 1990. Oxygen at high concentration reduces the response of *Phaseolus* stomata to light. *Photosynthetica* **24** (4): 607–612.
- [44] MORISON J. I. L. 1987. Intercellular  $CO_2$  concentration and stomatal response to  $CO_2$ . W: E. ZEIGER, G. D. FARQUAR, I. R. COWAN (red.), *Stomatal Function*, Stanford University Press, Stanford, CA, s. 229–252.
- [45] MORISON J. I. L. 1998. Stomatal response to increased  $CO_2$  concentration. *J. Exp. Bot.* **49**: 443–452.
- [46] MOTT K. A. 1988. Do stomata respond to  $CO_2$  concentrations other than intercellular? *Plant Physiol.* **86**: 200–203.
- [47] MOTT K. A., BUCKLEY T. N. 1998. Stomatal heterogeneity. *J. Exp. Bot.* **49**: 407–417.
- [48] MOTT K. A., PARKHURST D. F. 1991. Stomatal responses to humidity in air and helox. *Plant Cell Environ.* **14**: 509–515.
- [49] OGAWA T., ISHIKAWA H., SHIMADA K., SHIBATA K., 1978. Synergistic action of red and blue light and action spectra for malate formation in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **142**: 111–114.
- [50] OUTLAW W. H. Jr. 1989. Critical examination of the quantitative evidence for and against photosynthetic  $CO_2$  fixation by guard cells. *Physiol. Plant.* **77**: 275–281.
- [51] PARVATHI K., RAGHAVENDRA A. S. 1997. Both rubisco and phosphoenolpyruvate carboxylase are beneficial for stomatal function in epidermal strips of *Commelina benghalensis*. *Plant Sci.* **124**: 153–157.
- [52] RAGHAVENDRA A. S. 1990. Blue light of stomata are mediated by the guard cell plasma membrane redox system distinct from the proton translocating ATPase. *Plant Cell Environ.* **13**: 105–110.
- [53] RASCHKE K. 1975. Stomatal action. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**: 309–340.
- [54] ROBINSON M. F., HEATH J., MANSFIELD T. A. 1998. Disturbances in stomatal behaviour caused by air pollutants. *J. Exp. Bot.* **49**: 461–469.
- [55] SCHORT T. W., BRIGGS W. R. 1994. The transduction of blue light signals in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 143–171.
- [56] SCHROEDER J. I., HAGIWARA S. 1989. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cell. *Nature* **338**: 427–430.
- [57] SCHROEDER J. I., HAGIWARA S. 1990. Repetitive increases in cytosolic  $Ca^{2+}$  of guard cells by absciscic acid activation of nonselective  $Ca^{2+}$  permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9305–9309.
- [58] SCHULZE E. D., KELLIHER F. M., LLOYD J., LEUNING R. 1994. Relationship among maximum stomatal conductance, ecosystem surface conductance, carbon assimilation rate, and plant nitrogen nutrition: a global ecology scaling exercise. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **25**: 629–660.
- [59] SHARKEY T. D., OGAWA T. 1987. Stomatal response to light. W: E. ZEIGER, G. D. FARQUAR, I. R. COWAN (red.), *Stomatal function*, Stanford University Press, Stanford, CA, s. 195–208.
- [60] SHIMAZAKI K.-I., ZEIGER E. 1985. Cyclic and non-cyclic photophosphorylation in isolated guard cells chloroplasts from *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **78**: 211–214.
- [61] SHIMAZAKI K.-I., OKAYAMA S. 1990. Calvin Benson cycle enzymes in guard-cell protoplasts and their role in stomatal movement. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **186**: 327–331.
- [62] SHIMAZAKI K.-I., TOMINAGA M., SHIGENAGA A. 1997. Inhibition of stomatal blue light response by varapamil at high concentration. *Plant Cell Physiol.* **38** (6): 747–750.
- [63] TAIZ L., ZEIGER E. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin Cummings Publ. Comp., Inc., Redwood City, Ca, s. 133–140.
- [64] TALBOTT L. D., ZEIGER E. 1996. Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. *Plant Physiol.* **111**: 1051–1057.
- [65] TALBOTT L. D., ZEIGER E. 1998. The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *J. Exp. Bot.* **49**: 329–337.
- [66] TALLMAN G. 1992. The chemiosmotic model of stomatal opening revised. *Crit. Rev. Plant Sci.* **11**(1): 35–57.
- [67] TARDIEU F., SIMONNEAU T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *J. Exp. Bot.* **49**: 419–432.
- [68] THOMPSON D. S., WILKINSON S., BACON M. A., DAVIES W. J. 1997. Multiple signals and mechanisms that re-

- gulate leaf growth and stomatal behaviour during water deficit. *Physiol. Plant.* **100**: 303–313.
- [69] TRETYN A. 1994. *Wapni w komórkach eukariotycznych*. PWN, Warszawa, s. 99–131.
- [70] VAVASSEUR A., LASCÉVE G., COUCHAT P. 1988. Oxygen-dependent stomatal opening in *Zea mays* leaves: effect of light and carbon dioxide. *Physiol. Plant.* **73**: 547–552.
- [71] VAVASSEUR A., LASCÉVE G., COUCHAT P. 1990. Different stomatal responses of maize leaves after blue or red illumination under anoxia. *Plant Cell Environ.* **13**: 389–394.
- [72] VOSKRESENSKAYA N. P. 1972. Blue light and carbon metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**: 219–234.
- [73] WARD J. M., SCHROEDER J. I. 1994. Calcium-activated  $K^+$  channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**: 669–683.
- [74] WARD J. M., PEI Z. M., SCHROEDER J. I. 1995. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* **7**: 833–844.
- [75] WEYERS J. D.B., LAWSON T. 1997. Heterogeneity in stomatal characteristics. *Adv. Bot. Res.* **26**: 317–351.
- [76] WILLMER C. M. 1983. *Stomata*. Longman, London, ss. 166.
- [77] WONG S. H., COVAN I. R., FARQUHAR G. D. 1985. Leaf conductance in relation to rate of  $CO_2$  assimilation. I. Influence of nitrogen nutrition, phosphorus nutrition, photon flux density, and ambient partial pressure of  $CO_2$  during ontogeny. *Plant Physiol.* **78**: 821–825.
- [78] WONG S. H., COVAN I. R., FARQUHAR G. D. 1985. Leaf conductance in relation to rate of  $CO_2$  assimilation. II. Effects of short-term exposures to different photon flux densities. *Plant Physiol.* **78**: 826–829.
- [79] WONG S. H., COVAN I. R., FARQUHAR G. D. 1985. Leaf conductance in relation to rate of  $CO_2$  assimilation. III. Influences of water stress and photoinhibition. *Plant Physiol.* **78**: 830–834.
- [80] ZEIGER E. 1983. The biology of stomatal guard cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **34**: 441–475.
- [81] ZEIGER E. 1986. The photobiology of stomatal movements. W: R. E. KENDRICK, G. H.M. KRONENBERG (red.), *Photomorphogenesis in Plants*, Martinus Nijhoff, DrbW. Junk Publishers, Dordrecht, s.391–413.
- [82] ZEIGER E. 1987. Cellular and functional properties of the stomatal response to blue light. W: H. SENGGER (red.), *Blue light responses: phenomena and occurrence in plants and microorganisms*. **2**, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL., s. 110–120.
- [83] ZEIGER E., HEPLER P. K. 1977. Light and stomatal function: blue light stimulates swelling of guard cell protoplast. *Science* **196**: 887–889.
- [84] ZEIGER E., FIELD C., MOONEY H. 1981. Stomatal opening at dawn: possible roles of the blue-light response in nature. W: H. SMITH (red.), *Plants and Daylight Spectrum*. Academic Press, London, s. 391–408.
- [85] ZEIGER E., IINO M., SHIMAZAKI K. I., OGAWA T. 1987. The blue – light response of stomata: mechanism and function. W: E. ZEIGER, G. D. FARQUHAR, I. R. COVAN (red.), *Stomatal Function*. Stanford University Press, Stanford, s. 209–227.
- [86] ZEIGER E., ZHU J. X. 1998. Role of zeaxanthin in blue light photoreception of light- $CO_2$  interactions in guard cells. *J. Exp. Bot.* **49**: 433–442.
- [87] ZEMEL E., GEPSTEIN S. 1985. Immunological evidence for the presence of ribulose biphosphate carboxylase in guard cells chloroplasts. *Plant Physiol.* **78**: 586–590.