

JAN BIAŁCZYK, ZBIGNIEW LECHOWSKI

FIZJOLOGICZNE I BIOCHEMICZNE ASPEKTY RUCHU KOMÓREK SZPARKOWYCH

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE GUARD CELLS MOVEMENT

Proces ewolucji doprowadził do wykształcenia u roślin wyższych epidermy, pokrytej kutikulą trudno przepuszczalną dla wody i gazów. Równocześnie wykształcone zostały aparaty szparkowe, umożliwiające regulację natężenia transpiracji, utrzymując równowagę termiczną liścia [37, 97], a także równowagę stosunków gazowych pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym liścia [9a]. Komórki szparkowe stanowią integralną część epidermy, kontaktując środowisko zewnętrzne i wewnętrzne stanowią jak gdyby drzwi, zabezpieczające integralność całego organizmu roślinnego. Podobnie jak membrany komórkowe pełnią funkcję kontroli przepuszczalności i dyfuzji jonów, aparaty szparkowe zapewniają stan homeostazy na poziomie organizmu [11, 101]. Aparaty szparkowe stanowią zaledwie 3—5% powierzchni liści, jednak ich bogactwo zróżnicowań morfologicznych i anatomicznych, a zwłaszcza duża sprawność mechanizmu działania jest wyrazem najlepszego przystosowania roślin wyższych do funkcjonowania w środowisku. Zmiany apertury szparek regulują stosunki gazowe wewnątrz liści, poziom transpiracji i natężenia fotosyntezy [4, 142]. Podstawowy mechanizm funkcjonowania szparek oparty jest na zmianach turgoru w komórkach szparkowych, przyszparkowych i epidermalnych, który związany jest ze zmieniającym się w nich potencjałem wody.

Pierwsze próby wyjaśnienia mechanizmu ich funkcjonowania formułowane były już w 1856 roku przez von Mohl [70]. Dalsze badania Lloida [50] i Scartha [109] doprowadziły do sformułowania hipotezy opartej na zmianach potencjału osmotycznego komórek szparkowych, wynikających ze zmiennej koncentracji

Wykaz stosowanych skrótów: ABA — kwas abscysynowy, AMP — adenozy-no-5'-monofosforan, ADP — adenozy-no-5'-dwufosforan, ATP — adenozy-no-5'-trójfosforan, FC — fuzykocyna, — IAA — kwas indolilo-3-octowy, OAA — kwas szczawiooctowy, PAR — promieniowanie fotosyntetycznie aktywne, PEP — fosfoenolopirogronian, 3-PGA — aldehyd 3-fosfoglicerolowy, P₁ — ortofosforan, PS — fotosystem, pyr — pirogronian, Rubisco-karboksylaza 1,5-dwufosforibulozowa, TP — fosforany związków trójwęglowych.

cukrów w formie glukozy lub skrobi. Stała się ona na wiele lat hipotezą obowiązującą. Na podstawie obserwacji stwierdzono obecność skrobi w chloroplastach komórek szparkowych w okresie fazy ich zamknięcia oraz jej zanik w fazie otwarcia. Degradacja skrobi mogła więc umożliwić obniżenie potencjału osmotycznego w komórkach szparkowych, wzrost ich turgoru i ich otwarcie. Okres nocny natomiast miał być związany z procesami odwrotnymi. W kilku proponowanych teoretycznych modelach funkcjonowania aparatów szparkowych rozpatrywano także wpływ koncentracji CO_2 na stopień zakwaszenia cytoplazmy. Zmiany pH w obrębie cytoplazmy mogłyby stanowić mechanizm regulujący aktywność enzymów odpowiedzialnych za degradację i syntezę skrobi. Szczegółowe kalkulacje wykazały jednak, że zmiany w poziomie kwasu węglowego wynikające z koncentracji CO_2 są nieznaczne i wahają się w granicach 0.2 jednostki pH [95, 96]. Zmiany te są więc zbyt niskie, aby mogły stanowić skuteczny mechanizm kontrolujący metabolizm komórek szparkowych.

Opublikowane już w 1905 roku przez Macullema [53] oraz w 1943 roku przez Imamura [35] wyniki badań wiążące ruch szparek ze zmianami poziomu K^+ były nie zauważane i wobec nieprzyjmowania ich przez zachodnią szkołę fizjologów roślin, w tym głównie przez fizjologów amerykańskich, nie odegrały istotnego znaczenia dla zmiany modelu funkcjonowania aparatów szparkowych. Właściwe badania nad fizjologicznymi i biochemicznymi aspektami mechanizmu ruchu aparatów szparkowych są znacznie młodsze i obejmują w zasadzie ostatnie dwudziestolecie. W końcu lat sześćdziesiątych ilość zebranych informacji przy zastosowaniu licznych technik badawczych doprowadziła do zweryfikowania pierwotnych hipotez i pozwoliła na zaproponowanie pełniejszego obrazu mechanizmu funkcjonowania aparatów szparkowych. Wyniki badań, które doprowadziły do powstania nowego hipotetycznego modelu są przedmiotem rozważań niniejszego artykułu.

Techniki uzyskiwania materiału do badań komórek szparkowych

Aparaty szparkowe stanowią zwarty funkcjonalnie i anatomicznie kompleks. Niezależnie od morfologicznych różnicowań zbudowane są one z komórek szparkowych oraz różnej liczby komórek przyszparkowych kontaktujących się z komórkami epidermalnymi. Komórki szparkowe wyróżniają się od innych komórek liścia pewnymi charakterystycznymi cechami: silnie zgrubiałymi ścianami komórkowymi, nielicznymi chloroplastami, często w formie zdegenerowanej, niewielką liczbą zanikających plazmodesm łączących komórki szparkowe z epidermą oraz zawierają jedną lub kilka wstęgowatego kształtu wakuoli, które zwiększają powierzchnię kontaktu z cytoplazmą [20, 108].

Badania tak skomplikowanego systemu wymagały opracowania wielu specjalistycznych metod. Zasadniczo można je podzielić na następujące grupy: a) badania prowadzone na aparatach szparkowych w całych liściach bez ograniczenia naturalnych uwarunkowań ich funkcji, b) stosowanie zdartej epidermy, c) stosowanie izolowanych komórek szparkowych oraz d) protoplastów komórek szparkowych.

Pomiar transpiracji jest wspólną techniką dla studiów ruchu szparek w całym liściu. Umożliwia ona charakterystykę interakcji pomiędzy mezofilem i epidermą, a także analizę funkcjonowania szparek w warunkach polowych [19, 37]. Wartości uzyskiwane poprzez pomiar transpiracji stwarzają także możliwość kalkulacji stopnia przewodnictwa pary wodnej przez komórki szparkowe, a w połączeniu z wartościami natężenia fotosyntezy pozwalają oszacować stosunki gazowe w przestworach międzykomórkowych [10, 16, 44, 142].

Szczególnie często stosowano badania funkcjonowania aparatów szparkowych w zdartej epidermie [15, 64, 138, 139]. Użyteczność tej metody jest jednakże ograniczona wieloma czynnikami. Epidermalne zdarcia mogą prowadzić do uszkodzenia pewnych partii komórek. Brak kontaktu z mezofilem jest zastępowany w tego typu doświadczeniach poprzez dobór odpowiednich pożywek [33, 130], których skład, zwłaszcza jonowy, może modyfikować naturalne funkcje komórek szparkowych.

W przypadku badań biochemicznych należy krytycznie uwzględnić fakt zanieczyszczenia epidermy fragmentami mezofilu, chloroplastów i ścian komórkowych. Te ograniczenia są szczególnie istotne w określaniu składu i aktywności enzymów [76]. Pewną możliwością ograniczenia ilości zanieczyszczeń jest dodatkowe stosowanie sonikacji komórek epidermalnych [74] lub traktowanie ich roztworami o niskich wartościach pH [57, 127]. Interesująca metoda uzyskiwania materiału do badań biochemicznych polega na zamrażaniu liści w ciekłym azocie, a następnie w wyniku suszenia materiału doprowadzenia do wypadania par komórek szparkowych [75].

Postęp w rozwoju metod enzymatycznego trawienia ścian komórkowych pozwolił na izolację nieuszkodzonych protoplastów komórek szparkowych [137, 145, 149]. Tak uzyskany materiał okazał się niezwykle przydatny w analizach biochemicznych, a także w badaniu wpływu takich czynników jak światło czy hormony roślinne [8, 112, 150]. Przy zastosowaniu tej metody można było także uzyskiwać frakcje organelli komórek szparkowych np. wakuoli [145] czy chloroplastów [82, 113].

Typy ruchu komórek szparkowych

Apertura szparki uzależniona jest od wypadkowej wartości potencjału wody nie tylko w samych komórkach szparkowych, ale także w przylegających komórkach towarzyszących i epidermalnych [31, 65, 97].

Liniowy gradient potencjału wody decyduje o kierunku jej przepływu, zmianach turgoru, a w konsekwencji o stopniu otwarcia szparki. Szybkie zmiany w dostępności wody mogą prowadzić do przemijającego i krótkotrwałego ruchu szparek [65, 97]. Ten rodzaj ruchów nazwany jest ruchem „hydropasywnym”, a jego badanie wiąże się z koniecznością stosowania skomplikowanej aparatury i specjalnych technik badawczych. Z „hydropasywnym” ruchem aparatów szparkowych wiąże się także oddziaływanie niedosytu wilgotności powietrza. W eksperymentach przeprowadzonych na zdartej epidermie przy zastosowaniu mikroskopowych obserwacji aparatów szparkowych oraz równoczesnym kierowaniu na nie poprzez system

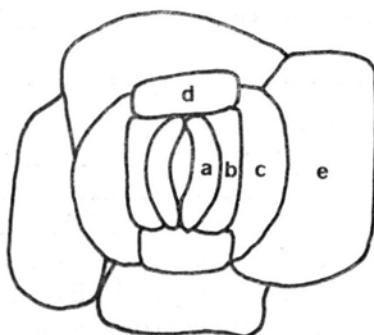
kapilar powietrza o wysokim niedosycie wilgotności uzyskiwano zamykanie szparek [45, 47]. Reakcja ta była odwracalna przez zastosowanie powietrza o wysokim stopniu wilgotności. Wydaje się prawdopodobne, że u pewnych gatunków, z uwagi na budowę anatomiczną, same komórki szparkowe mogą wykazywać zdolność szybkiej odpowiedzi na stan nasycenia pary wodnej w otaczającym liść środowisku zewnętrznym. Występujące np. u *Quercus robur* komórki szparkowe wykazują pewne niepogrubione i nieskutynizowane fragmenty ścian komórkowych, co umożliwia im znacznie szybszą transpirację wody w porównaniu z komórkami przyszparkowymi i epidermalnymi [59]. Oddziaływanie niedosytu wilgotności na stan apertury szparki nie można oddzielić od równoczesnego działania temperatury. W przypadku otwarcia szparek w warunkach światła, maksimum otwarcia uzyskiwano przy 35°C [104]. W ciemności w wysokich temperaturach następuje także otwarcie szparek, ale maksimum otwarcia występowało przy 45°C [48, 128]. Na podstawie licznych badań uważa się, że ten typ reakcji może inicjować ruchy komórek szparkowych, które są utrwalane następnie poprzez wymagające czasu procesy prowadzące do zmian potencjału osmotycznego w komórkach szparkowych [56, 59, 97].

W przeciwieństwie do opisanych powyżej, zmiany turgoru uwarunkowane mechanizmem działania pomp elektrogenicznych, przemieszczeniami jonów i związków organicznych pomiędzy komórkami szparkowymi, przyszparkowymi i epidermalnymi nazywane są ruchami „hydroaktywnymi”. Ten rodzaj ruchów aparatów szparkowych zależy od licznych czynników między innymi działania światła, hormonów roślinnych i koncentracji CO₂.

Znaczenie jonów K⁺ w regulacji ruchu aparatów szparkowych

Wyniki licznych badań potwierdziły istotne różnice w koncentracji jonów K⁺, skorelowane ściśle ze stanami otwarcia lub zamknięcia szparki [27, 31, 68, 97]. Wskazują one także na ważną rolę potasu w regulacji osmotikum komórek szparkowych. Pomimo rozbieżności w bezwzględnych wartościach, przyjmuje się, że jony K⁺ stanowią w komórkach szparkowych jedną czwartą lub nawet połowę substancji osmotycznie czynnych [54, 58, 97]. Na istotną rolę jonów K⁺ w regulacji turgoru wskazuje fakt, że uzyskanie maksymalnej apertury szparek możliwe jest jedynie w pożywkach zawierających w swoim składzie potas [3, 21] oraz powszechny jego udział w regulacji turgoru komórek szparkowych u wszystkich badanych gatunków roślin [13, 38, 77]. Tylko u nielicznych gatunków wykazano, że w pewnym zakresie potas może być zastąpiony przez jony Na⁺, jednak w przypadku całkowitego braku K⁺ apertura szparki nie osiąga nigdy maksymalnej wartości [17, 33, 56]. Zmiany koncentracji potasu są ściśle powiązane z działaniem elektrogenicznej H⁺-pompy, umożliwiającej w okresie otwierania szparek transport jonów K⁺ wbrew gradientowi dyfuzyjnemu [31, 57, 88, 97]. H⁺-pompa zlokalizowana w plazmolemie decyduje o aktywnej (zależnej od światła) sekrecji jonów H⁺ do apoplastu. Działanie H⁺-pompy wymaga nakładu energii i aktywności odpowiednich ATP-az. W poprzek błony komórkowej w wyniku separacji H⁺/OH⁻ powstaje pierwotny

gradient potencjałów; elektrycznego i pH umożliwiający transport jonów K^+ z komórek przyszparkowych lub apoplastu do wnętrza komórek szparkowych w miejsce wydalanych do apoplastu jonów H^+ [5, 30, 90, 126]. Zasadnicza część jonów K^+ jest deponowana w wakuoli komórek szparkowych. Koncentracja jonów K^+ w cytoplazmie jest niska i nie ulega w zasadzie większym zmianom w okresach zamknięcia i otwarcia szparki [98, 143]. Przemieszczanie jonów K^+ jest często stowarzyszone z równoczesnym transportem jonów Cl^- [2, 89, 114, 115, 133]. Zmiany koncentracji K^+ w obrębie kompleksu aparatu szparkowego *Commelina communis* ilustrują



Rys. 1. Schemat kompleksu szparkowego *Commelina communis* [59] oraz koncentracja jonów K^+ ($mol \cdot m^{-3}$) w komórkach kompleksu szparkowego [88]

	szparka otwarta	szparka zamknięta
a komórki szparkowe	448	95
b wewnętrzne boczne komórki przyszparkowe	293	156
c zewnętrzne boczne komórki przyszparkowe	98	199
d graniczące komórki przyszparkowe	169	298
e komórki epidermalne	73	448

wyniki uzyskane przez Penny i Bowling (88, rys. 1). W okresie otwarcia szparek koncentracja K^+ jest kilkakrotnie wyższa w komórkach szparkowych. Podczas zamknięcia natomiast największą jego zawartość wykazują komórki epidermalne. Analiza podanych w tabeli wartości wskazuje także potencjalne drogi przemieszczania jonów K^+ . Transport jonów K^+ jest pośrednio aktywny, poprzedzony uruchomieniem elektrogenicznych H^+ -pomp i sekrecją H^+ do apoplastu [58]. W okresie zamknięcia szparki zmienia się kierunek przepływu jonów. Transport jonów K^+ w membranach plazmatycznych odbywa się prawdopodobnie specjalnymi kanałami transportu potasu.

Jak wynika z ostatnich badań, jony Ca^{2+} mogą ograniczać aktywność pomp elektrogenicznych prowadząc do zamykania szparek [9, 36, 100]. W plazmolemie komórek szparkowych postulowano obecność dwóch izoenzymów H^+ -ATP-az; aktywnej w okresie otwarcia szparek („ATP-aza 7.5”) oraz aktywnej w okresie zamknięcia („ATP-aza 5.5”). Wykazują one różne optima pH oraz różną wrażliwość jonową [41, 42, 52, 94]. ATP-azie zależnej od Ca^{2+} przypisuje się istotny udział w promowaniu zamykania szparek [94, 116] poprzez redukcję ciśnienia turgorowego [140] oraz hamowanie wbudowywania K^+ [21].

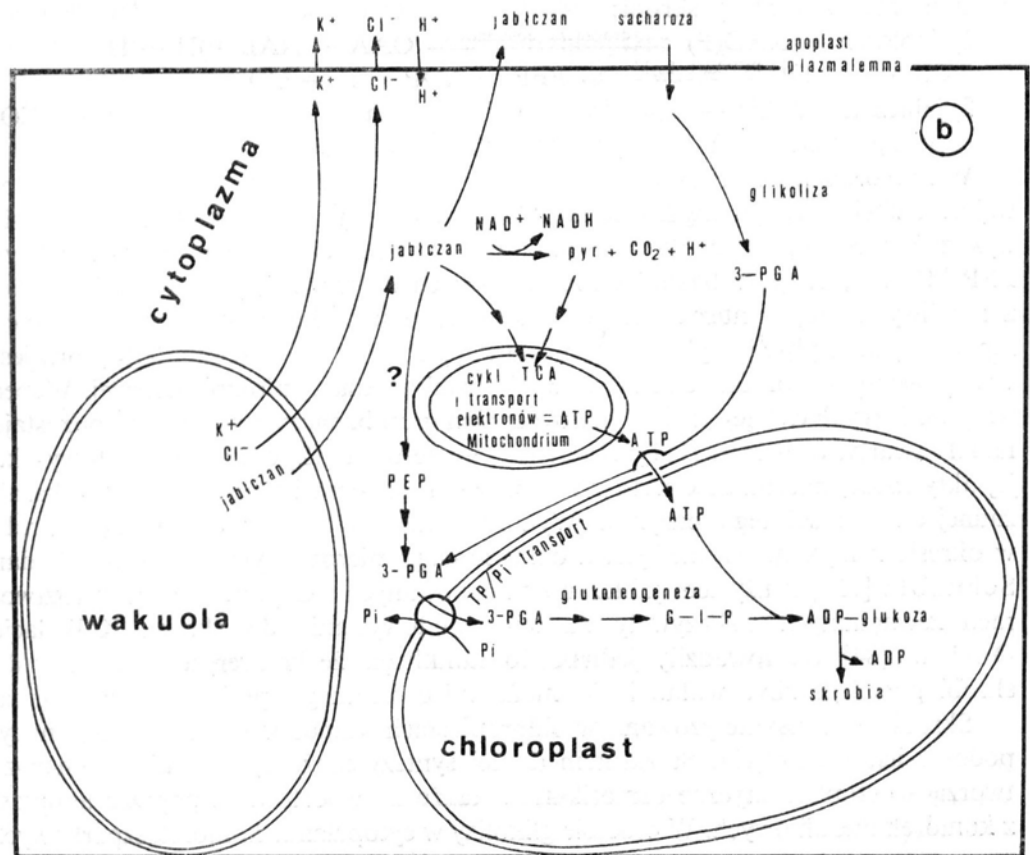
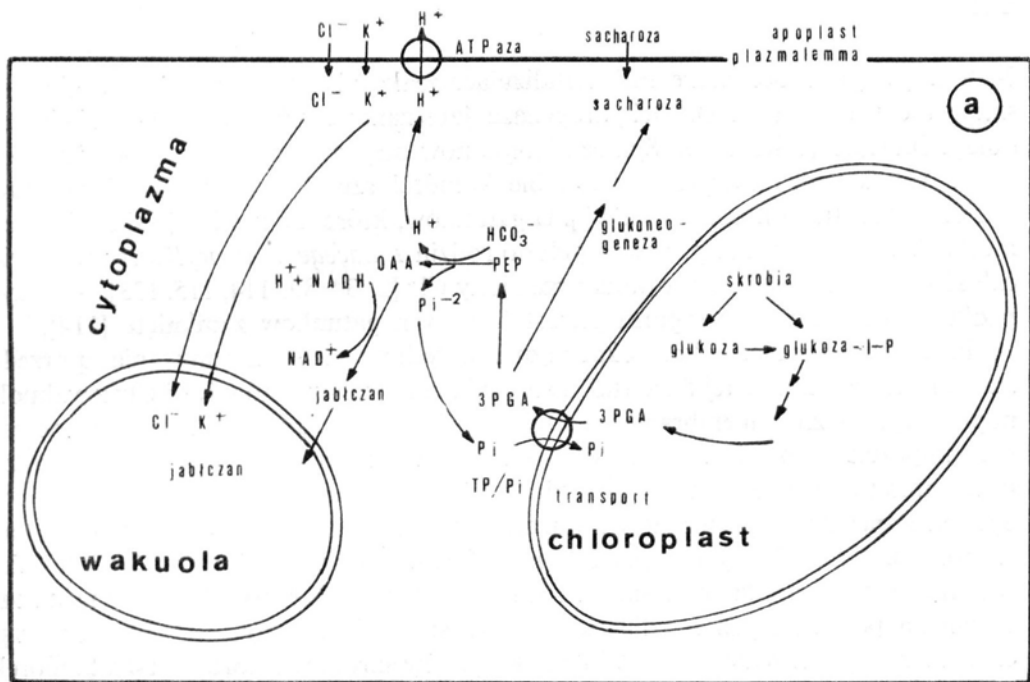
Ze wzrostem koncentracji potasu wiąże się ściśle odpowiednia koncentracja jonów Cl^- lub w przypadku ich ograniczonej dostępności zwiększona synteza jabłczanów [2, 76, 97, 99, 133]. W procesach dysocjacji jabłczany dostarczają protonów dla elektrogenicznego H^+ -pompy oraz jonów jabłczanowych [147]. Zarówno jony Cl^- jak i jabłczany stwarzają możliwość równoważenia przewagi ładunków dodatnich. W nielicznych doniesieniach podobną do jabłczanów rolę przypisuje się także cytrynianowi, glutaminianowi i asparaginianowi [2, 76].

Fizjologiczne i biochemiczne procesy warunkujące ruch komórek szparkowych

Otwieraniu szparek, jak wykazano poprzednio, towarzyszy wzrost koncentracji jonów K^+ w komórkach szparkowych, pierwotnym procesem jest jednakże uaktywnienie elektrogenicznego H^+ -pompy. Sekrecja jonów H^+ poprzez plazmolemę do apoplastu rozpoczyna na masową skalę wnikanie jonów K^+ do cytoplazmy, a następnie do wakuoli komórek szparkowych. Wnikaniu jonów K^+ towarzyszy równoczesny import jonów Cl^- . W przypadku pełnej dostępności jonów Cl^- około 90% jonów K^+ jest przez nie balansowane [99]. Całkowita zawartość potasu w obrębie cytoplazmy pozostaje stała zarówno w fazie otwarcia jak i zamknięcia szparek [143]. Jony K^+ transportowane do wakuoli komórek szparkowych obniżają w nich potencjał wody. Nie jest prawdopodobne, aby mogły wystąpić znaczne różnice w potencjale wody wakuoli i cytoplazmy. Taki stan prowadziłby do odwodnienia białek cytoplazmy [98]. Przyjmuje się, że wartość potencjału wody w różnych kompartmentach komórki jest zbliżona [89]. Osmotikum cytoplazmy w odróżnieniu od wakuoli jest tworzone przez sacharozę [2, 76, 77], prolinę i glicynę [59]. Outlaw i Manchester [79] wykazali wzrost koncentracji sacharozy w komórkach szparkowych podczas ich otwarcia. Syntezę [43] i akumulację [22, 24] sacharozy obserwowano w warunkach wysokich koncentracji jonów nieorganicznych. Zwiększenie jej poziomu w cytoplazmie prowadzi do obniżenia aktywności jonowej [134] oraz stabilizacji białek [46]. Sacharozie przypisuje się także istotny udział obok jonów K^+ w tworzeniu pierwotnego osmotikum w komórkach szparkowych [56].

Utworzona w okresie nocy i magazynowana w chloroplastach komórek szparkowych skrobia (rys. 2a) ulega pod wpływem α i β amylaz oraz przy udziale fosforylasy skrobiowej degradacji do maltozy i dalszej do glukozy-1P. Glukoza lub glukozy-1P są w procesie glikolizy rozkładane do aldehydu 3-P glicerolowego (3PGA). Związek ten w transporcie wymiennym z P_i ulega przemieszczaniu do cytoplazmy [28] stanowiąc substrat do syntezy fosfoenolopirogronianu (PEP) oraz w drodze glukoneogenezy do syntezy glukozy, a następnie w dalszej kolejności sacharozy [102]. W przypadku niedostatecznej dostępności Cl^- wzrost koncentracji K^+ prowadzi do stopniowej alkalizacji cytoplazmy. Wzrost pH cytoplazmy w zakresie

Rys. 2. Schemat procesów metabolicznych zachodzących w komórkach szparkowych w czasie otwarcia (a) i zamknięcia (b) szparki [102, zmodyfikowano]



7—8 aktywuje karboksylazę PEP katalizującą reakcję karboksylacji PEP do kwasu szczawiooctowego (OAA). Dehydrogenaza jabłczanowa przeprowadza reakcję redukcji OAA do jabłczanów. Synteza jabłczanów odgrywa szczególną rolę w zachowaniu równowagi elektrycznej w obrębie komórek szparkowych w okresie wzrostu poziomu dodatnich ładunków [2, 97]. U gatunków, które nie zawierają skrobi w komórkach szparkowych, np. należących do rodzin *Liliaceae* i *Amarylidaceae*, prawie całość jonów K^+ jest balansowana przez jony Cl^- [2, 34, 89, 114, 115, 133]. W przypadku braku jonów Cl^- szparki pozostają u tych gatunków zamknięte [114].

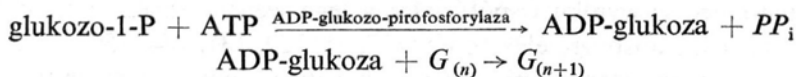
Procesy zachodzące w komórkach szparkowych podczas ich zamykania są przedstawione na rys. 2b. W tej fazie ruchu stwierdzono wpływ jonów K^+ i Cl^- z wakuoli poprzez cytoplazmę i membrany komórek szparkowych do apoplastu przy równoczesnym imporcie jonów H^+ . Zmniejsza się również koncentracja jabłczanów, a także uruchomiona zostaje synteza skrobi w chloroplastach komórek szparkowych. Spadek koncentracji jabłczanów związany jest z ich eksportem do apoplastu oraz komórek przyszparkowych i epidermalnych [133]. Pewna pula jabłczanów jest skierowana do mitochondriów i stanowi substrat w cyklu Krebsa [86]. Jedną z rozważanych potencjalnych możliwości wykorzystania jabłczanów jest hipoteza włączenia ich poprzez syntezę 3PGA i PEP do syntezy skrobi w chloroplastach komórek szparkowych. Teoretycznie istnieją następujące drogi syntezy PEP [14] jako głównego substratu do syntezy skrobi:

- 1) jabłczan + NAD(P) $\xrightarrow{\text{dehydrogenaza jabłczanowa}}$ OAA + NAD(P)H + H^+
 OAA + ATP $\xrightarrow{\text{PEP-karboksykinaza}}$ PEP + ADP + P_i + CO_2
- 2) jabłczan + NAD + $\xrightarrow{\text{enzym jabłczanowy}}$ pirogronian + NADH + H^+ + CO_2
 pirogronian + ATP + P_i $\xrightarrow{\text{kinaza 2-P-pirogronianowa}}$ PEP + AMP + PP_i

W komórkach szparkowych potwierdzono obecność dehydrogenazy jabłczanowej umożliwiającej syntezę kwasu szczawiooctowego, jednakże nigdy nie udało się wykazać w nich PEP-karboksykinazy, co wyklucza na tej drodze możliwość syntezy PEP [81, 111, 129]. W badaniach zmierzających do wykazania egzystencji drugiej z możliwych dróg syntezy PEP, obecność enzymu jabłczanowego w komórkach szparkowych nigdy nie była kwestionowana [81, 111, 129]. Przedmiotem sporu jest występowanie w komórkach szparkowych dwufosfokinazy pirogronianowej. Wobec wzajemnie wykluczających się wyników dwóch grup badaczy, problem ten pozostaje nadal otwarty. Schnabl [111], Das i Raghavendra [12] dokumentowali wysoką jej aktywność, natomiast Outlaw i wsp. [81] i Thorpe i wsp. (129) nie wykazali żadnej aktywności tego enzymu. Wykorzystanie jabłczanów do syntezy skrobi w okresie zamykania szparki jest w dalszym ciągu nierozstrzygnięte. Wyniki badań Schnabla [110] z użyciem jabłczanów znakowanych ^{14}C podawanych w roztworach zewnętrznych wskazywały na ich wbudowywanie do skrobi. Kalkulacje Outlaw [84] doprowadziły jednak do konkluzji, że konwersja jabłczanów do skrobi przebiega zbyt wolno i nie może mieć istotnego praktycznie znaczenia.

Skrobia jest resyntetyzowana w chloroplastach komórek szparkowych w nocy, podczas ich zamknięcia. Substratem do tej syntezy może być również sacharoza tworząca cytoplazmatyczne osmotikum, a także transportowana poprzez apoplast z komórek mezofilowych. W procesie glikolizy w cytoplazmie komórek szparkowych

powstaje 3PGA, który podlega transportowi do chloroplastów w drodze wymiany z ortofosforanem. W chloroplastach 3PGA ulega konwersji do glukozy-1-P w drodze glukoneogenezy. Dalsze przemiany glukozy-1-P do skrobi przedstawiają poniższe równania:



Aktywność ADP-glukozy-pirofosforylazy jest uzależniona od stosunku $3\text{PGA}/P_i$ [83, 92, 103]. Wysoki stosunek $3\text{PGA}/P_i$ aktywuje enzym indukując syntezę skrobi, niski natomiast wywiera efekt hamujący.

W porównaniu z komórkami szparkowymi synteza skrobi w komórkach mezofilowych zachodzi podczas oświetlenia, co wiąże się z wysokim wówczas stosunkiem $3\text{PGA}/P_i$ [91]. Związane jest to z wysoką aktywnością Rubisco, enzymu odpowiedzialnego za intensywne wiązanie CO_2 w procesie fotosyntezy i syntezę dużej puli 3PGA. 3PGA kierowany jest zarówno do utrzymania cyklu Calvina-Bensona jak również zużywany do syntezy sacharozy i skrobi. Z drugiej strony ma miejsce obniżenie puli P_i poprzez jego zużywanie w procesach fotofosforylacji [91].

W przeciwieństwie do komórek mezofilowych, komórki szparkowe wykazują niski stosunek $3\text{PGA}/P_i$ w ciągu dnia. Przy użyciu czułych metod immunofluorescencyjnych [80, 84] wykazany został brak Rubisco w chloroplastach komórek szparkowych. Brak tego enzymu wyklucza fotosyntetyczne wiązanie CO_2 w cyklu Calvina-Bensona. Niski stosunek $3\text{PGA}/P_i$ w ciągu dnia wynika z braku syntezy 3PGA. Koncentracja P_i w komórkach szparkowych nie ulega większym zmianom w różnych fazach ruchu szparki [83]. W czasie zamknięcia szparki i w okresie nocnym wzrasta ilość 3PGA w wyniku degradacji i włączenia do procesu glikolizy sacharozy stanowiącej osmotikum cytoplazmy. Obniżenie puli sacharozy związane jest z koniecznością wyrównania potencjału wody pomiędzy wakuolą a cytoplazmą [56, 76]. Również w tej fazie ruchu ma miejsce import sacharozy z komórek mezofilowych spowodowany intensywną degradacją w nich skrobi [75, 76]. Procesy te prowadzą do wzrostu stosunku $3\text{PGA}/P_i$ i aktywacji ADP-glukozy-pirofosforylazy [83].

Komórki szparkowe *Paphiopedilum* zawierają bezchlorofilowe plastydy [72, 107, 145], w których w okresie nocnym następuje synteza skrobi [107]. Przypadek ten potwierdza możliwość syntezy skrobi w komórkach szparkowych bez włączenia fotosyntetycznej redukcji CO_2 . Przedstawiony powyżej schemat procesu syntezy skrobi w komórkach szparkowych jest podobny do jej biosyntezy w innych nefotosyntetyzujących organach roślin.

Energetyka i rola światła w ruchu komórek szparkowych

Bioenergetyczne podstawy ruchu komórek szparkowych są nadal kontrowersyjne. Funkcjonowanie pomp jonowych, sekrecja H^+ oraz transport jonów wymagają nakładu energii. Chemiosmotyczna teoria zakłada niezbędność pewnych źródeł energii koniecznych dla przepływu protonów w systemach biologicznych, głów-

nie membranowo-związanych ATP-az oraz łańcucha transportu elektronów [147]. Potencjalne źródła energii w komórkach szparkowych związane są z procesami fosforylacji oksydatywnej i fotofosforylacji [31, 67, 146, 151, 152]. W oparciu o przeprowadzone badania zakłada się także udział w generacji energii fotoreceptora światła niebieskiego w wyniku współdziałania jego wewnątrzmembranowego kompleksu z łańcuchem transportu elektronów [37, 51, 122, 131, 144, 150]. W badaniach przeprowadzonych na zdartej epidermie *Commelina communis* wykazano, że FC wywiera stymulujący efekt na otwieranie szparek zarówno w świetle jak i w ciemności [55, 63, 138]. Otwieranie szparek w ciemności indukowane działaniem FC było hamowane przez równoczesne zastosowanie KCN [63]. Otwarcia szparek w ciemności pod wpływem FC nie uzyskiwano również w przypadku, gdy preparat znajdował się w warunkach beztlenowych [60, 117]. Występowanie w komórkach szparkowych licznych mitochondriów [31, 65, 96] oraz przeprowadzone doświadczenia z KCN lub warunkami beztlenowymi, potwierdzają udział fosforylacji oksydatywnej w dostarczaniu energii dla ruchu szparek [60, 61, 96]. W preparatach potraktowanych KCN, a następnie poddanych działaniu światła białego uzyskano efekt szerokiego otwarcia szparek, co wyraźnie wskazuje także na możliwość wykorzystania w tej reakcji energii generowanej w procesie fotofosforylacji. W epidermie roślin wyższych chloroplasty zwykle występują w komórkach szparkowych [65]. Chloroplasty te nie wykazują obecności enzymów cyklu Calvina-Bensona [78], jednakże zawierają aktywne PS I i PS II, co umożliwia produkcję ATP i równoważnika redukcyjnego [82, 120, 146].

Działanie światła o różnych zakresach spektralnych modyfikuje reakcje komórek szparkowych [26]. Największą aktywność wykazuje światło niebieskie działające w bardzo niskich natężeniach, poniżej progu aktywacji procesu fotosyntezy. Absorpcja w świetle niebieskim związana jest więc z niezależnym od PAR systemem fotorecepcji [37, 51, 73, 87, 119, 131, 148]. Światło niebieskie wykazuje aktywność głównie w zakresie 400–450 nm [150]. Jego działanie wywiera stymulujący wpływ na modyfikację biosyntezy jabłczanów, wzrost transpiracji oraz wzrost objętości protoplastów komórek szparkowych [7, 74, 121, 150]. Zeiger i Hepler [149] wykazali, że protoplasty komórek szparkowych *Allium cepa* powiększały swą objętość w świetle niebieskim od 35 do 60%.

Światło niebieskie jest odpowiedzialne w komórkach szparkowych za wzrost przewodnictwa CO₂, nie prowadzi jednak do obniżenia jego koncentracji w przestworach międzykomórkowych [118]. Działa ono w natężeniach niższych od progu aktywacji fotosyntezy [119], prawdopodobnie poprzez membranowy kompleks flawinowy i łańcuch transportu elektronów [144]. Na podstawie kalkulacji liczby kwantów niezbędnych do uzyskania podobnego stopnia otwarcia szparek wykazano, że działanie światła niebieskiego jest około 44 razy bardziej efektywne w porównaniu ze światłem czerwonym [149].

Światło czerwone działa w wysokich natężeniach [118], stymulując fotosyntezę w komórkach mezofilowych [67]. Jest ono absorbowane przez system barwników fotosyntetycznych. Intensyfikacja procesu fotosyntezy w komórkach mezofilowych prowadzi do obniżania koncentracji CO₂ w przestworach międzykomórkowych,

stymulując otwieranie szparek [37]. Jego oddziaływanie nie wywiera jednak wpływu na zmianę przewodnictwa CO_2 komórek szparkowych [148].

Ruchy aparatów szparkowych są procesem niezwykle złożonym i wielokierunkowym. Z licznych badań wynika, że otwieranie aparatów szparkowych może nastąpić w nocy poprzez zmianę takich czynników jak podwyższenie temperatury [4,65] czy też obniżenie stężenia CO_2 [37]. Efekty oddziaływania światła są wyraźnie sprzężone z innymi czynnikami modyfikującymi ruchy szparek.

Działanie światła może stymulować ruchy aparatów szparkowych również poprzez udział systemu fitochromowego. Na kompleksach szparkowych *Commelina communis* wykazano, że niskie natężenia światła podczerwonego (około 730 nm) dawkowane samo lub równocześnie ze światłem czerwonym hamowało otwieranie szparek [105, 106]. Prawdopodobny więc wydaje się także udział fitochromu w regulacji rytmiki dobowej ruchu oraz kontroli przepuszczalności membran podczas ruchu komórek szparkowych (106).

Wpływ CO_2 na ruch aparatów szparkowych

W świetle i w ciemności apertura szparki jest skorelowana z koncentracją CO_2 w przestworach międzykomórkowych liścia [61, 97]. Koncentracja CO_2 ulega okresowym cyklicznym wahaniom. W czasie zamknięcia szparek zwłaszcza w okresie nocnym koncentracja CO_2 ulega w liściu podwyższeniu w związku z zachodzącymi procesami oddechowymi. W ciągu dnia natomiast wykorzystywanie CO_2 w procesie fotosyntezy redukuje jego poziom w przestworach międzykomórkowych [71]. Same komórki szparkowe nie posiadają możliwości fotosyntetycznej redukcji CO_2 [76, 78]. Jedynym dobrze udokumentowanym procesem wykorzystującym CO_2 w komórkach szparkowych jest karboksylacja PEP do OAA, co prowadzi do redukcji koncentracji CO_2 . W warunkach eksperymentalnych wzrost koncentracji CO_2 prowadzi do szybkich, wymagających zaledwie kilku sekund, reakcji zamykania szparek [95]. Procesy te są zbyt szybkie, aby mogły być tłumaczone wyłącznie wiązaniem CO_2 przez PEP, reakcja ta jest jednym z czynników dodatkowo modyfikujących poziom CO_2 [1, 2, 74]. Opłukiwanie powierzchni liści charakteryzujących się wysoką koncentracją CO_2 w przestworach międzykomórkowych, powietrzem pozbawionym CO_2 prowadziło do otwarcia aparatów szparkowych [59]. Efekty działania CO_2 tłumaczy się: modyfikacją własności błony komórkowej, stopniem zakwaszenia cytoplazmy komórek szparkowych, wykorzystywaniem HCO_3^- jako przeciwnika jonowego dla kationów, zmianami oporu dyfuzyjnego komórek szparkowych [23, 31, 97, 147] oraz hamującym wpływem na natężenie procesów fotofosforylacji [31, 65, 85, 152]. Zmiany w koncentracji CO_2 mogą jednakże prowadzić do różnych specyficznych gatunkowo reakcji ruchowych komórek szparkowych [37, 118, 141] uzależnionych od stresu wodnego [97] czy też zróżnicowanego natężenia procesów fotofosforylacji w ich chloroplastach [66].

Rola hormonów roślinnych w regulacji apertury szparek

Działanie hormonów roślinnych, ich poziom i wzajemny stosunek stanowią ważny czynnik regulujący odpowiedź komórek szparkowych. Ich efekt podobnie jak i w innych procesach fizjologicznych wyraża się także w przypadku ruchu komórek szparkowych często przeciwstawnymi reakcjami. Zamknięciu aparatów szparkowych towarzyszy ścisła korelacja wzrostu koncentracji endogennego ABA. Jego ilość wzrasta także podczas stresu wodnego roślin [60, 69, 93, 135]. Wykazano, że podczas pierwszych 30 min. działania stresu wodnego poziom endogennego ABA w liściach pszenicy wzrastał około 40 razy, a potencjał wody ulegał wówczas obniżeniu z $-0,9$ do $-1,1$ MPa [59]. Na podstawie badań Pierce i Raschke [89a] wydaje się jednak, że decydujące znaczenie dla wzrostu poziomu endogennego ABA ma wpływ raczej obniżenie turgoru komórek niż spadek potencjału wody [29].

Wiele dyskusji i wątpliwości związane było z miejscem biosyntezy ABA. Początkowo uważano, że nie może on być syntetyzowany w komórkach szparkowych. Najnowsze badania wydają się potwierdzać te przypuszczenia z uwagi na wysoką koncentrację w komórkach szparkowych związków osmotycznie czynnych, które decydują o ich znacznie niższym potencjale wody w stosunku do sąsiadujących komórek [49]. Przy zastosowaniu precyzyjnych technik immunochemicznych wykazano, że biosynteza ABA zachodzi w cytoplazmie komórek mezofilowych oraz potwierdzono jego transport do komórek szparkowych [49, 62]. Chloroplasty są obecnie uważane za miejsce akumulacji ABA z uwagi na fakt, iż jedynie one posiadają odpowiednio wysokie pH stromy [39]. Taka lokalizacja ABA umożliwia także odpowiednio szybką mobilizację jego aktywnych form. ABA może występować w formach zmodyfikowanych: tj. kwasu fazeinowego, kwasu dwuhydroksyfazeinowego oraz β -D-glukopiranozyłu [6, 135, 136]. Aktywność fizjologiczną wykazuje ABA oraz kwas fazeinowy. Pozostałe nieaktywne formy wymagają reakcji hydrolizy (przebiegających wolno) do przejścia w formę fizjologicznie aktywną [25, 153].

ABA wywiera efekt fizjologiczny w niezwykle niskich rozcieńczeniach. W doświadczeniach z traktowaniem preparatów zdartej epidermy roztworem egzogenego 10^{-9} M ABA uzyskiwano jeszcze 30% zamknięcie szparek [40]. ABA działa przy plazmolemie i tonoplaście modyfikując ich przepuszczalność [40], co prowadzi do wypływu z komórek K^+ i Cl^- [55, 138] oraz promuje transport H^+ do ich wnętrza [55].

Przeciwstawne do efektów działania ABA reakcje ruchowe aparatów szparkowych stymuluje IAA. Jego działanie wyraża się promowaniem procesów otwierania szparek. IAA działa przy plazmolemie indukując aktywność pomp elektrogeniczych. H^+ wypływa na zewnątrz komórek szparkowych, a w jego miejsce transportowane są i akumulowane jony K^+ i Cl^- . IAA powoduje także hyperpolaryzację błon komórkowej i stymulację biosyntezy jabłczanów [123, 124, 125]. Podobne działanie do IAA wykazuje grzybowa toksyna FC [63, 132].

Jak wynika z najnowszych badań, pewną rolę w modyfikacji apertury szparek mogą odgrywać także naturalne i syntetyczne cytokiny [39, 59]. Po potraktowaniu liści trawy *Anthephora pubescens* egzogennymi cytokininami występował wzrost

apertury szparek o około 50% [39]. Fizjologiczna natura ich oddziaływania na ruch komórek szparkowych nie jest obecnie wyjaśniona. Można przypuszczać, że poziom produkcji cytokinin w korzeniu oraz ich transport do liści może stanowić o interesującym sposobie przekazywania z korzenia do komórek szparkowych informacji o stopniu dostępności wody w podłożu. Z drugiej strony niski poziom cytokinin decyduje o wzroście biosyntezy lub uruchamianiu nieaktywnych form ABA oraz o spadku koncentracji IAA [18].

LITERATURA

- [1] Allaway W. G., 1973. Accumulation of malate in guard cells of *Vicia faba* during stomatal opening. *Planta* 110 : 63—70.
- [2] Allaway W. G., 1981. Anions in stomatal operation. W: *Stomatal Physiology*, eds P. G. Jarvis, T. A. Mansfield. Soc. Exp. Biol. Cambridge: Cambridge Univ. Press, str. 295.
- [3] Allaway W. G., Hsiao T. G., 1973. Preparation of rolled epidermis of *Vicia faba* L. so that stomata are the only viable cells: Analysis of guard cell potassium by flame photometry. *Aust. J. Biol. Sci.* 26 : 309—318.
- [4] Bingham G. E., Coyne O. I., 1977. A portable, temperature-controlled, steady-state porometer for field measurements of transpiration and photosynthesis. *Photosynthesis* 11 : 148—160.
- [5] Blatt M. R., 1987. Electrical characteristic of stomatal guard cells: The ionic basis of the membrane potential and the consequence of potassium chloride leakage from microelectrodes. *Planta* 170 : 272—287.
- [6] Boyer G. L., Zeevaart J. A. D., 1982. Isolation and quantitation of β -D-glucopyranosyl abscisate from leaves of *Xanthium* and spinach. *Plant Physiol.* 70 : 227—231.
- [7] Brogardh T., Johnsson A., 1975. Regulation of transpiration in *Avena*. Responses to white light steps. *Physiol. Plant.* 35 : 115—125.
- [8] Brown P. H., Outlaw W. H., 1982. Effect of fusicoccin on dark $^{14}\text{CO}_2$ fixation by *Vicia faba* L. guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* 70 : 1700—1703.
- [9] Cocucci M. C., Marrè E., 1984. Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate-inhibited, Mg^{2+} -ATPase from radish microsomes. *Bioch. Biophys. Acta* 771 : 42—52.
- [9a] Cowan I. R., 1982. Regulation of water use in relation to carbon gain in higher plants. W: *Physiological Plant Ecology*, eds O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, H. Zeigler, *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series 12B : 589—613, Heidelberg:Springer.
- [10] Cowan I. R., Farquhar G. D., 1977. Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 31 : 471—505.
- [11] Curtis H., 1979. *Biology*. New York: Worth. str. 1043.
- [12] Das V. S. R., Raghavendra A. S., 1974. Control of stomatal opening by pyruvate metabolism in light. *Ind. J. Exp. Biol.* 12 : 425—428.
- [13] Dayanandan P., Kaufman P. B., 1975. Stomatal movements associated with potassium fluxes. *Am. J. Bot.* 62 : 221—231.
- [14] Edwards G. E., Huber S. C., 1981. The C_4 pathway, W: *Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise*, eds P. K. Stump, Conn E. E. Academic Press: New York, Vol. 8 str. 237—281.
- [15] Edwards M., Meidner H., Sheriff D. W., 1976. Direct measurements of turgor pressure potentials of guard cells. II. The mechanical advantage of subsidiary cells, the Spannungsphase, and the optimum leaf water deficit. *J. Exp. Bot.* 27 : 163—171.
- [16] Ehleringer J., Björkman O., 1977. Quantum yields for CO_2 uptake in C_3 and C_4 plants. Dependence on temperature, CO_2 , and O_2 concentration. *Plant Physiol.* 59 : 86—90.

- [17] Eshel A., Waisel Y., Ramati A., 1974. The role of sodium in stomatal movements of a halophyte: A study by x-ray microanalysis. W: Plant Analysis and Fertilizer Problems. Proceedings of 7th International Colloquium. German Society of Plant Nutrition, Hanover.
- [18] Even-Chen Z., Atsman D., Itai Ch., 1978. Hormonal aspects of senescence in detached tobacco leaves. *Physiol. Plant.* 44 : 377—387.
- [19] Farguhar G. D., Sharkey T. D., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 33 : 317—345.
- [20] Faraday C. D., Thomson W. W., Platt-Aloia K. A., 1982. Comparative ultrastructure of guard cells of C₃, C₄ and CAM plants. W: Crassulacean Acid Metabolism, eds I. P. Ting, Gibbs M., Waverly Press: Baltimore, str. 18—30.
- [21] Fischer R. A., 1972. Aspects of potassium accumulation by stomata of *Vicia faba*. *Austr. J. of Biol. Sci.*, 25 : 1107—1123.
- [22] Ford C. W., Wilson J. R., 1981. Changes in level of solutes during osmotic adjustment to water stress in leaves of four tropical pasture species. *Aust. J. Plant Physiol.* 8 : 77—91.
- [23] Gepstein S., Jacobs M., Taiz L., 1982. Inhibition of stomatal opening in *Vicia faba* epidermal tissue by vandate and abscisic acid. *Plant Sci. Lett.* 28 : 63—72.
- [24] Gorhan J., Hughes L. I., Wyn Jones R. G., 1981. Low-molecular weight carbohydrates in some salt-stressed plants. *Physiol. Plant.* 53 : 27—33.
- [25] Grantz D. A., Ho T. D., Uknes S. J., Cheeseman J. M., Boyer J. S., 1985. Metabolism of abscisic acid in guard cells of *Vicia faba* L. and *Commelina communis* L. *Plant Physiol.* 78 : 51—56.
- [26] Habermann H. M. 1973. Evidence for two photoreactions and possible involvement of phytochrome in light-dependent stomatal opening. *Plant Physiol.* 51 : 543—548.
- [27] Hastings D. F., Gutknecht J., 1978. Potassium and turgor pressure in plants. *J. Theor. Biol.* 73 : 363—366.
- [28] Heber U., Heldt H. W., 1981. The chloroplast envelope: Structure, function and role in leaf metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32 : 139—168.
- [29] Henson I. E., Mahalakshmi V., Bidinger F. R., Alagaraswamy G., 1981. Genotypic variation in pear millet *Pennisetum americanum* (L. Leeke) in its ability to accumulate abscisic acid in response to water stress. *J. Exp. Bot.* 32 : 899—910.
- [30] Hodges T. K., 1976. ATPases associated with membranes of plant cells. W: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 2a, eds U. Lüttge, Pitman M. G., Springer-Verlag: Berlin, str. 260—283.
- [31] Hsiao T. C., 1976. Stomatal ion transport. W: Transport in Plants. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 2b, eds U. Lüttge, Pitman M. G., Springer-Verlag: Berlin, str. 195—221.
- [32] Hsiao T. C., Allaway W. E., Evans L. T., 1973. Action spectra for guard cell Rb⁺ uptake and stomatal opening in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 51 : 82—88.
- [33] Humble G. D., Hsiao T. C., 1969. Specific requirement of potassium for light-activated opening of stomata in epidermal strips. *Plant Physiol.* 44 : 230—234.
- [34] Humble G. D., Raschke K., 1971. Stomatal opening quantitatively related to potassium transport, evidence from electron probe analysis. *Plant Physiol.* 48 : 447—453.
- [35] Imamura S., 1943. Untersuchungen über den Mechanismus der Turgorschwankung der Spaltöffnungs-Schliesszellen. *Jpn. J. Bot.* 12 : 765—770.
- [36] Inoue H., Katoh Y., 1987. Calcium inhibits ion-stimulated opening in epidermal strips of *Commelina communis* L. *J. Exp. Bot.* 38 : 142—149.
- [37] Jarvis P. G., Morison J. I. L., 1981. The control of transpiration and photosynthesis by the stomata. *Soc. Exp. Biol.* 8 : 247—279.
- [38] Jeschke W. D., 1976. Ionic relations of leaf cells. W: Transport in Plants, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 2b, eds U. Lüttge, Pitman M. G., Springer: Berlin, str. 160—194.
- [39] Jewer P. C., Incoll L. D., 1980. Promotion of stomatal opening in the grass *Antheophora pubescens* Nees by a range of natural and synthetic cytokinins. *Planta* 150 : 218—221.
- [40] Jewer P. C., Incoll L. D., Howarth G. L., 1981. Stomatal responses in isolated epidermis of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoë diademontiana* Hamet et Perr. *Planta* 153 : 238—245.

- [41] Kasamo K., 1979. Characterization of membrane-bound Mg^{++} -activated ATPase isolated from the lower epidermis of tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 20 : 281—292.
- [42] Kasamo K., 1979. Effect of abscisic acid on membrane-bound epidermal ATPase from tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 20 : 293—300.
- [43] Kirst G. O., 1980. $^{14}CO_2$ fixation in *Valonia utricularis* subjected to water stress. *Plant Sci. Lett.* 18 : 155—160.
- [44] Körner Ch., Scheel J. A., Bauer H., 1979. Maximum leaf diffusive conductance in vascular plants. *Photosynthesis* 13 : 45—82.
- [45] Lange O. L., Lösch R., Schulze E. D., Kappen L., 1971. Responses of stomata to changes in humidity. *Planta* 100 : 76—86.
- [46] Lee J. C., Timasheff S. N., 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256 : 7193—7201.
- [47] Lösch R., 1977. Responses of stomata to environmental factors—experiments with isolated epidermal strips of *Polypodium vulgare*. I. Temperature and humidity. *Oecologia* 29 : 85—97.
- [48] Lösch R., Tenhunen J. D., 1981. Stomatal responses to humidity—phenomenon and mechanism. W: *Stomatal Physiology*, eds Jarvis P. G., T. A. Mansfield Soc. Exp. Biol., Cambridge Univ. Press: Cambridge, str. 295.
- [49] Loveys B. R., 1977. The intracellular location of abscisic acid in stressed and non-stressed leaf tissue. *Physiol. Plant.* 40 : 6—10.
- [50] Lloyd F. E., 1908. The physiology of stomata. Carnegie Inst. Washington. Publ. No. 82.
- [51] Lurie S., 1978. The effect of wavelength of light on stomatal opening. *Planta* 140 : 245—249.
- [52] Lurie S., Hendrix D. L., 1979. Differential ion stimulation of plasmolemma adenosine triphosphatase from leaf epidermis and mesophyll of *Nicotiana rustica* L. *Plant Physiol.* 63 : 936—939.
- [53] Macallum A. B., 1905. On the distribution of potassium in animal and vegetable cells. *J. Physiol.* 32 : 95—118.
- [54] MacRobbie E. A. C., 1977. Functions of ion transport in plant cells and tissues. *Int. Rev. Biochem.* II 13 : 211—247.
- [55] MacRobbie E. A. C., 1981. Effects of ABA in „isolated” guard cells of *Commelina communis* L. *J. Exp. Bot.* 32 : 563—572.
- [56] MacRobbie E. A. C., 1981. Ionic relations of stomatal guard cells. W: *Stomatal Physiology*, eds Jarvis P. G., Mansfield T. A., Cambridge Univ. Press; Cambridge str. 51—70.
- [57] MacRobbie E. A. C., Lettau J., 1980. Ion content and aperture in „isolated” guard cells of *Commelina communis* L. *J. Membr. Biol.* 53 : 199—205.
- [58] MacRobbie E. A. C., Lettau J. 1980. Potassium content and aperture in „intact” stomatal and epidermal cells of *Commelina communis* L. *J. Membr. Biol.* 56 : 249—256.
- [59] Mansfield T. A., 1983. Movements of stomata. *Sci. Prog. Oxf.* 68 : 519—542.
- [60] Mansfield T. A., Davies W. J., 1981. Stomata and stomatal mechanisms. W: *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, eds Pa leg L. G., Aspinall D., Academic: San Francisco, str. 492.
- [61] Mansfield T. A., Travis A. J., Jarvis R. G., 1981. Responses to light and carbon dioxide. W: *Stomatal Physiology*, eds Jarvis P. G., Mansfield T. A., Soc. Exp. Biol. Cambridge Univ. Press: Cambridge, str. 71—85.
- [62] Mansfield T. A., Wellburn A. R., Moreira T. J. S., 1978. *Phil. Trans. Roy. Soc. B* 284 : 471. (cytat za. Mansfield T. A., *Stomatal movement. Soc. Prog. Oxf.*, 68 : 519—542).
- [63] Marrè E., 1979. Fusicoccin: a tool in plant physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30 : 273—288.
- [64] Meidner H., 1981. Measurements of stomatal aperture and responses to stimuli. W: *Stomatal Physiology*, eds Jarvis P. G., Mansfield T. A., Cambridge Univ. Press: Cambridge, str. 25—49.
- [65] Meidner H., Mansfield T. A., 1968. *Physiology of Stomata*. Mc raw-Hill; London, str. 179.
- [66] Melis A., Harvey G. W., 1981. Regulation of photosystem stoichiometry chlorophyll a and chlorophyll b content and relation to chloroplast ultrastructure. *Biochem. Biophys. Acta* 637 : 138—145.

- [67] Melis A., Zeiger E., 1982. Chlorophyll a fluorescence transients in mesophyll and guard cells. Modulation of guard cell photophosphorylation by CO₂. *Plant Physiol.* 69 : 642—647.
- [68] Mengel K., Kirkby E. A., 1980. Potassium in crop production. *Adv. Agron.* 33 : 59—110.
- [69] Milborrow B. V., 1981. Abscisic acid and other hormones. W: *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, eds Paleg L. G., Aspinall D., Academic: San Francisco, str. 347—388.
- [70] Mohl H. von, 1856. Welche Ursachen bewirken Erweiterung und Verengung der Spaltöffnungen? *Bot. Z.* 14 : 697—704.
- [71] Morison J. I. L., Jarvis P. G., 1983. Direct and indirect effects of light on stomata. II. In *Commelina communis* L. *Plant Cell Environ.* 6 : 103—109.
- [72] Nelson S. D., Mayo J. M., 1975. The occurrence of functional non-chlorophyllous guard cells in *Paphiopedilum* spp. *Can. J. Bot.* 53 : 1—7.
- [73] Ogawa T., 1981. Blue light response of stomata with starch-containing (*Vicia faba*) and starch-deficient (*Allium cepa*) guard cells under background illumination with red light. *Plant Sci. Lett.* 22 : 103—108.
- [74] 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 : 61—65.
- [75] Outlaw W. H. Jr., 1978. Biochemical analysis of single plant cells. *What's New in Plant Physiology.* *Plant Physiol.* 9 : 21—24.
- [76] Outlaw W. H. Jr, 1982. Carbon metabolism in guard cells. W: *Cellular and Subcellular Localization in Plant Metabolism*, eds Creasy L. L. Hrazdina G., Plenum: New York. str. 185—222.
- [77] Outlaw W. H. Jr, 1983. Current concepts on the role of potassium in stomatal movements. *Physiol. Plant.* 59 : 302—311.
- [78] Outlaw W. H. Jr, Manchester J., DiCamelli C. A., Randall D. D., Rapp B., Veith G. M., 1979. Photosynthetic carbon reduction pathway is absent in chloroplasts of *Vicia faba* guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 6371—6375.
- [79] Outlaw W. H. Jr, Manchester J., 1979. Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiol.* 64 : 79—82.
- [80] Outlaw W. H. Jr, Fisher D. B., Christy A. L., 1975. Compartmentation in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiology* 55 : 704—711.
- [81] Outlaw W. H. Jr, Manchester J., Brown P. H., 1981. High levels of malic enzyme activities in *Vicia faba* L. epidermal tissue. *Plant Physiol.* 68 : 1047—1051.
- [82] Outlaw W. H. Jr, Mayne B. C., Zenger V. E., Manchester J., 1981. Presence of both photosystems in guard cells of *Vicia faba* L., implications for environmental signal processing. *Plant Physiol.* 67 : 12—16.
- [83] Outlaw W. H. Jr, Tarczyński M. C., 1984. Guard cells starch biosynthesis regulated by effectors of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 74 : 424—429.
- [84] Outlaw W. H. Jr, Tarczyński M. C., Anderson L. C., 1982. Taxonomic survey for the presence of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in guard cells. *Plant Physiol.* 70 : 1218—1220.
- [85] Pallas J. E. Jr, Dilley R. A., 1972. Photophosphorylation can provide sufficient adenosine 5'-triphosphate to drive K⁺ movements during stomatal opening. *Plant Physiol.* 49 : 649—650.
- [86] Pallas J. E. Jr, Mollenhauer H. H., 1972. Physiological implications of *Vicia faba* and *Nicotiana tabacum* guard cell ultrastructure. *Am. J. Bot.* 59 : 504—514.
- [87] Pemadasa M. A., 1982. Abaxial and adaxial stomatal responses to light of different wavelengths and to phenylacetic acid on isolated epidermes of *Commelina communis* L. *J. Exp. Bot.* 33 : 92—96.
- [88] Penny M. G., Bowling D. J. F., 1974. A study of potassium gradients in the epidermis of intact leaves of *Commelina communis* L. in relation to stomatal opening. *Planta* 119 : 17—25.
- [89] Penny M. G., Kelday L. S., Bowling D. J. F., 1976. Active chloride transport in the leaf epidermis of *Commelina communis* in relation to stomatal activity. *Planta* 130 : 291—294.
- [89a] Pierce M., Raschke K., 1980. Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves. *Planta* 148 : 174—182.
- [90] Poole R. J., 1978. Energy coupling for membrane transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29 : 437—460.

- [91] Preiss J., 1984. Starch, sucrose biosynthesis and partition of carbon in plants are regulated by orthophosphate and triose-phosphates. *TIBS* 9 : 24—27.
- [92] Preiss J., Levi C., 1980. Starch biosynthesis and degradation. W: *Biochemistry of Plants*, eds Stumpf P. K., Conn E. E., Acad. Press: New York, 371—423.
- [93] Radin J. W., Ackerson R. C., 1982. Does abscisic acid control stomatal closure during water stress? *What's New in Plant Physiol.* 13 : 9—12.
- [94] Raghavendra A. S., Rao I. M., Das V. S. R., 1976., Adenosine triphosphatase in epidermal tissue of *Commelina benghalensis*: Possible involvement of isoenzymes. *Plant Sci. Lett.* 7 : 391—396.
- [95] Raschke K., 1972. Saturation kinetics of the velocity of stomatal closing in response to CO₂. *Plant Physiol.* 49 : 229—234.
- [96] Raschke K., 1975. Stomatal action. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26 : 309—340.
- [97] Raschke K., 1979. Movements of stomata W: *Physiology of Movements*, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, eds Haupt W., Feinleib M. E., Springer: Berlin, 7 : 383—441.
- [98] Raschke K., Fellows M. P., 1971. Stomatal movement in *Zea mays*: Shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells. *Planta* 101 : 296—316.
- [99] Raschke K., Schnabl H., 1978. Availability of chloride affects the balance between potassium chloride and potassium malate in guard of off *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 62 : 84—87.
- [100] Rasi-Caldogno F., Pugliarello M. C., De Michellis M. I., 1985. Electrogenic transport of protons driven by the plasma membrane ATPase in membrane vesicles form radish. *Biochemical characterization.* *Plant Physiol.* 77 : 200—205.
- [101] Raven J. A., 1981. Introduction to metabolic control. W. *Mathematics and Plant Physiology*, eds Rose D. A., Charles-Edwards D. A., Academic: New York, str. 3—27.
- [102] Robinson N., Preiss J., 1985. Biochemical phenomena associated with stomatal function. *Physiol. Plant.* 64 : 141—146.
- [103] Robinson N., Zeiger E., Preiss J., 1983. Regulation of ADPglucose synthesis in guard cells of *Commelina communis*. *Plant Physiol.* 73 : 862—864.
- [104] Rogers C. A., Sharpe P. J. H., Powell R. D., Spence R. D., 1981. High-temperature disruption of guard cells of *Vicia faba*. Effect on stomatal aperture. *Plant Physiol.* 67 : 193—196.
- [105] Roth-Bejerano N., Itai C., 1981. Involvement of phytochrome in stomatal effect of blue and red light. *Physiol. Plant.* 52 : 201—206.
- [106] Roth-Bejerano N., Nejidat A., Itai C., 1982. Phytochrome-membrane interactions as a factor in stomatal opening. *Physiol. Plant.* 56 : 80—83.
- [107] Rutter J. C., Willmer C. M., 1979. A light and electron microscopy study of the epidermis of *Paphiopedilum* spp., with emphasis on stomatal ultrastructure. *Plant Cell Environ.* 2 : 211—219.
- [108] Sanchez S. M., 1977. The fine structure of the guard cells of *Helianthus annuus*. *Am. J. Bot.* 64 : 814—824.
- [109] Scarth G. W., 1927. Stomatal movement: Its regulation and regulatory role. A review. *Protoplasma* 2 : 498—511.
- [110] Schnabl H., 1980. CO₂ and malate metabolism in starch-containing and starch-lacking guard-cell protoplasts. *Planta* 149 : 52—58.
- [111] Schnabl H., 1981. The compartmentation of carboxylating and decarboxylating enzymes in guard cell protoplasts. *Planta* 152 : 397—313.
- [112] Schnabl H., Bornman C. H., Ziegler H., 1978. Studies on isolated starch-containing (*Vicia faba*) and starch-deficient (*Allium cepa*) guard cell protoplasts. *Planta* 143 : 33—39.
- [113] Schnabl H., Hampp R., 1980. *Vicia* guard cell protoplasts lack photosystem II activity. *Naturwiss.* 67 : 465—466.
- [114] Schnabl H., Raschke K., 1980. Potassium chloride as stomatal osmoticum in *Allium cepa* L., a species devoid of starch in guard cells. *Plant Physiol.* 65 : 88—93.
- [115] Schnabl H., Ziegler H., 1977. The mechanism of stomata movement in *Allium cepa* L. *Planta* 136 : 37—43.
- [116] Schwartz A., 1985. Role of Ca²⁺ and EGTA on stomatal movement in *Commelina communis* L. *Plant Physiol.* 79 : 1003—1005.

- [117] Schwartz A., Zeiger E., 1982. Bioenergetics of stomatal opening. *Plant Physiol.* 69 : 83 Abstr.
- [118] Sharkey T. D., Raschke K., 1981. Separation and measurement of direct and indirect effects of light on stomata. *Plant Physiol.* 68 : 33—40.
- [119] Sharkey T. D., Raschke K., 1981. Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.* 68 : 1170—74.
- [120] Shimazaki K., Gotow K., Kondo N., 1982. Photosynthetic properties of guard cell protoplasts from *Vicia faba* L. *Plant Cell. Physiol.* 23 : 871—879.
- [121] Skaar H., Johnsson A., 1978. Rapid, blue light induced transpiration in *Avena*. *Physiol. Plant.* 43 : 390—396.
- [122] Skaar H., Johnsson A., 1980. Light induced transpiration in a chlorophyll deficient mutant of *Hordeum vulgare*. *Physiol. Plant.* 49 : 210—214.
- [123] Snaith P. J., Mansfield T. A., 1982. Control of the CO₂ responses of stomata by indol-3ylacetic acid and abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 33 : 360—365.
- [124] Snaith P. J., Mansfield T. A., 1982. Stomatal sensitivity to abscisic acid: Can it be defined? *Plant Cell Environ.* 5 : 309—311.
- [125] Snaith P. J., Mansfield T. A., 1984. Studies of the inhibition of stomatal opening by naphth-1-ylacetic acid and abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 35 : 1410—1418.
- [126] Spanswick R. M., 1981. Electrogenic ion pumps. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32 : 267—289.
- [127] Squire G. R., Mansfield T. A., 1972. A simple method of isolating stomata on detached epidermis by low pH treatment: observations of the importance of the subsidiary cells. *New Phytol.* 71 : 1033—1043.
- [128] Stålfelt M. G., 1962. The effect of temperature on opening of the stomatal cells. *Physiol. Plant.* 15 : 772—779.
- [129] Thorpe N., Brady C. J., Milthorpe F. L., 1978. Stomatal metabolism: Primary carboxylation and enzyme activities. *Aust. J. Plant. Physiol.* 5 : 485—493.
- [130] Travis A. J., Mansfield T. A., 1979. Stomatal responses to light and CO₂ are dependent on KCl concentration. *Plant. Cell Environ.* 2 : 319—323.
- [131] Travis A. J., Mansfield T. A., 1981. Light saturation of stomatal opening on the adaxial and abaxial epidermis of *Commelina communis*. *J. Exp. Bot.* 32 : 1169—1179.
- [132] Turner N. C., Grant A., 1969. Fusicoccin: a fungal toxin that open stomata. *Nature* 223 : 1070—1071.
- [133] Van Kirk C. A., Raschke K., 1978. Presence of chloride reduces malate production in epidermis during stomatal opening. *Plant Physiol.* 61 : 361—364.
- [134] Vassilev L., Russev G., 1981. Ion activity decrease in the presence of sucrose. *Biochem. Biophys. Acta* 675 : 214—216.
- [135] Walton D. C., 1980. Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31 : 453—489.
- [136] Walton D. C., Sondheimer E., 1972. Metabolism of [2—¹⁴C] (±)-abscisic acid in excised bean axes. *Plant Physiol.* 49 : 285—289.
- [137] Weyers J. D. B., Fitzsimons P. H., Mansey G. M., Martin E. S., 1983. Guard cell protoplasts—Aspects of work with an important new research tool. *Physiol. Plant* 58 : 331—339.
- [138] Weyers J. D. B., Hellman J. R., 1980. Effects of abscisic acid on ⁸⁶Rb⁺ fluxes in *Commelina communis* L. leaf epidermis. *J. Exp. Bot.* 31 : 711—720.
- [139] Weyers J. D. B., Travis A. J., 1981. Selection and preparation of leaf epidermis for experiments on stomatal physiology. *J. Exp. Bot.* 32 : 837—850.
- [140] Willmer C. M., Mansfield T. A., 1986. A critical examination of the use of detached epidermis in studies of stomatal physiology. *New Phytol.* 68 : 363—375.
- [141] Wong S. C., Cowan I. R., Farquhar G. D., 1978. Leaf conductance in relation to assimilation in *Eucalyptus pauciflora* Sieb. ex Spreng. *Plant Physiol.* 62 : 670—674.
- [142] Wong S. C., Cowan I. R., Farquhar G. D., 1979. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* 282 : 424—426.
- [143] Wyn Jones R. G., Storea R., Leigh R. A., Ahmad N., Pollard A., 1977. A hypothesis on cyto-

- plasmic osmoregulation. W: Regulation of Cell Membrane Activity in Plants, eds Marrè E., Cifeeri O., Elsevier: Amsterdam, str. 121—136.
- [144] Zeiger E., 1980. The blue light response of stomata and the green vacuolar fluorescence of guard cells. W: The Blue Light Syndrome, ed. Senger H., Springer: Berlin, str. 629—636.
- [145] Zeiger E., 1981. Novel approaches to the biology of stomatal guard cells: protoplast and fluorescence studies. W: Stomatal Physiology, eds Jarvis P. G., Mansfield T. A., Cambridge Univ. Press: Cambridge, str. 103—117.
- [146] Zeiger E., Armond P., Melis A., 1981. Fluorescence properties of guard cell chloroplasts. *Plant Physiol.* 67 : 17—20.
- [147] Zeiger E., Bloom A. J., Hepler P. K., 1978. Ion transport in stomatal guard cells: A chemiosmotic hypothesis. *What's New in Plant Physiology* 9 : 29—32.
- [148] Zeiger E., Field C., 1982. Photocontrol of the functional coupling between photosynthesis and stomatal conductance in the intact leaf. *Plant Physiol.* 70 : 370—375.
- [149] Zeiger E., Hepler P. K., 1976. Production of guard cell protoplasts from onion and tobacco. *Plant Physiol.* 58 : 492—498.
- [150] Zeiger E., Hepler P. K., 1977. Light and stomatal function: blue light stimulates swelling of guard cell protoplasts. *Science* 196 : 887—889.
- [151] Zeiger E., Moody W., Hepler P. K., Varela F., 1977. Light-sensitive membrane potentials in onion guard cells. *Nature* 270 : 270—271.
- [152] Zelitch I., 1965. Environmental and biochemical control of stomatal movement in leaves. *Biol. Rev.* 40 : 463—482.
- [153] Zeevaart J. A. D., Boyer G. L., 1982. Metabolism of ABA in *Xanthium strumarium* and *Ricinus communis*. W: Plant Growth Substances, ed. Wareing P., Academic Press: London, str. 335—342.

Dr Jan Białczyk

Dr Zbigniew Lechowski

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin

Uniwersytetu Jagiellońskiego

al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków