

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha 2008

Eva Husáková

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie rostlin



diplomová práce

Struktura kořenového systému kukuřice seté; vliv fytohormonů

Root structure of maize; effect of phytohormones

Eva Husáková

Praha 2008

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Olga Votrubová, CSc.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Zuzana Lenochová

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Dr. Olgy Votrubové a že nebyla předložena jako diplomová práce na žádné jiné vysoké škole.

V Praze 1. 9. 2008

Eva Husáková

PODĚKOVÁNÍ:

- RNDr. Olze Votrubové, CSc. za milý a ochotný přístup, se kterým ke mně vždy přistupovala, za její laskavost a trpělivost
- RNDr. Zuzaně Lenochové za ochotu, povzbuzení a všestrannou pomoc
- RNDr. Aleši Soukupovi, PhD. za podnětné připomínky a vstřícnost
- Mgr. Aleně Černíkové a Mgr. Miroslavovi Srbovi za pomoc při statistickém hodnocení výsledků
- Mgr. Drahomíře Bartákové a Lence Moravcové za pomoc při odběrech
- Všem členům našeho týmu za přátelskou atmosféru a nezištnou pomoc
- Všem ostatním členům z Katedry fyziologie rostlin v Praze za příjemné pracovní prostředí

- Mé rodině za nesmírnou podporu při studiu, za porozumění a psychickou podporu
- Pepovi za jeho neobyčejnou trpělivost

Finanční zajištění práce:

- Regulace a morfogeneze rostlinných buněk a orgánů,
Centrum základního výzkumu LC06034

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

IAA	kyselina indol-3-octová
IAA ⁻ /IAAH	disociovaná forma IAA/nedisociovaná forma IAA
1-NAA	kyselina naftalen-1-octová
IBA	kyselina indol-3-máselná
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
NPA	kyselina 1-N-naftalenftalamová
PAT	polární transport auxinu
pH	záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity protonů
AUX	vtokový přenašeč auxinu
PIN	výtokový přenašeč auxinu
ACC	kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová
SAM	S-adenosyl-L-methionin
1-AOA	kyselina aminooxo-octová
AVG	aminoethoxy-vinylglycin
PCD	programovaná buněčná smrt, programmed cell death
PK	postranní kořen/y
HK	hlavní kořen/y
AK	adventivní kořen/y
LDH	laktát dehydrogenáza
PDC	pyruvát dekarboxyláza
ADH	alkohol dehydrogenáza
ROL	radial oxygen loss
SE	střední chyba průměru, standard error

Označení variant kultivačních roztoků:

SK	světlo, kontrola
TK	tma, kontrola
SA	světlo, daná koncentrace auxinu
TA	tma, daná koncentrace auxinu
SIE	světlo, daná koncentrace inhibitoru syntézy ethylenu
TIE	tma, daná koncentrace inhibitoru syntézy ethylenu
SAIE	světlo, kombinace dané koncentrace auxinu s inhibitorem syntézy ethylenu
TAIE	tma, kombinace dané koncentrace auxinu s inhibitorem syntézy ethylenu
A, B, C	oblast poloviny, třech čtvrtin a báze hlavního kořene

OBSAH

1. PŘEDMLUVA	3
1.1. Cíl diplomové práce	4
2. LITERÁRNÍ ÚVOD	5
2.1. Zaplavení, vznik hypoxických podmínek	5
2.2. Adaptace rostlin k hypoxii	7
2.2.1. Porozita kořenů	8
2.2.2. Aerenchym	8
2.2.2.1. Typy aerenchymu	10
2.2.2.1.1. Schizogenní aerenchym.....	10
2.2.2.1.2. Expanzigenní aerenchym	11
2.2.2.1.3. Lyzigenní aerenchym	12
2.2.2.2. Konstitutivní a indukovaný vznik aerenchymu.....	14
2.2.2.3. Vnitřní a vnější podněty pro tvorbu indukovaného aerenchymu	15
2.2.2.4. Podrobnější analýza tvorby lyzigenního aerenchymu při hypoxii	16
2.3. Apoplastické bariéry	17
2.3.1. Endodermis.....	17
2.3.2. Exodermis.....	18
2.3.2.1. Konstitutivní a indukovaný vznik apoplastických bariér	21
2.3.2.2. Vliv podmínek prostředí na chemické složení apoplastických bariér ...	24
2.3.3. Souvislost vývoje apoplastických bariér s tvorbou aerenchymu a PK.....	25
2.4. Auxin	27
2.4.1. Syntéza auxinu a její lokalizace	27
2.4.2. Transport auxinu	28
2.4.3. Příjem auxinu	31
2.4.4. Projevy působení auxinu	32
2.5. Ethylen	33
2.5.1. Vznik ethylenu a jeho regulace	33
2.5.2. Receptory ethylenu a vedení signálu.....	35
2.5.3. Projevy působení ethylenu	36
2.6. Interakce mezi auxinem a ethylenem	38
3. MATERIÁL A METODIKA	41
3.1. Rostlinný materiál	41
3.2. Kultivace rostlin	41
3.2.1. Sterilizace a klíčení	41
3.2.2. Typy kultivací a kultivační podmínky	42
3.2.2.1. Vodní kultury	42
3.2.2.2. Kultivace v papíru	43
3.3. Experimentální varianty	45
3.3.1. Zpracování hlavních kořenů, vodní kultivace	45
3.3.2. Zpracování hlavních kořenů, kultivace v papíru	46
3.4. Sledované jevy	47
3.4.1. Sledované jevy na ručních řezech	47
3.4.2. Sledované jevy na trvalých preparátech.....	48
3.5. Statistické zpracování výsledků	50
4. VÝSLEDKY	52
4.1. Růstové charakteristiky	52
4.1.1. Vliv 1-NAA.....	52
4.1.1.1. Hydroponická kultivace	52

4.1.1.1.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8	52
4.1.1.1.2. Rostliny pěstované za stálé tmy	56
4.1.1.2. Papírová kultivace	59
4.1.1.2.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8	59
4.1.1.2.2. Rostliny pěstované za stálé tmy	61
4.1.2. Vliv 1-AOA	64
4.1.2.1. Hydroponická kultivace	64
4.1.2.2. Papírová kultivace	64
4.1.2.2.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8	64
4.1.2.2.2. Rostliny pěstované za stálé tmy	65
4.1.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA	67
4.1.3.1. Papírová kultivace	67
4.1.3.1.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8	68
4.1.3.1.2. Rostliny pěstované za stálé tmy	69
4.2. Analýza plochy aerenchymu	72
4.2.1. Vliv 1-NAA	72
4.2.2. Vliv 1-AOA	74
4.2.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA	75
4.3. Tloušťka primární kůry	77
4.3.1. Vliv 1-NAA	77
4.3.2. Vliv 1-AOA	78
4.3.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA	79
4.4. Počet vrstev primární kůry	80
4.4.1. Vliv 1-NAA	80
4.4.2. Vliv 1-AOA	81
4.4.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA	82
4.5. Histochemická detekce modifikace buněčných stěn	83
4.6. Počet cév pozdního metaxylému	86
4.6.1. Vliv 1-NAA	86
4.6.2. Vliv 1-AOA	88
4.6.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA	89
4.7. Průměr cév pozdního metaxylému	90
4.7.1. Vliv 1-NAA	90
4.7.2. Vliv 1-AOA	92
4.7.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA	93
5. DISKUZE	95
5.1. Kultivační postupy	95
5.2. Vliv fytohormonů na růstové charakteristiky rostlin	96
5.2.1. Účinky auxinu v závislosti na jeho množství	96
5.2.2. Vliv ethylenu, inhibice jeho syntézy	100
5.2.3. Složitý vztah mezi auxinem a ethylenem	102
5.3. Tvorba aerenchymu u kukuřice je ovlivnitelná mnoha faktory	103
5.4. Změny v tloušťce primární kůry	109
5.5. Změny v počtu jednotlivých vrstev primární kůry	111
5.6. Zjišťování počtu a průměru cév pozdního metaxylému	112
6. SHRUTÍ VÝSLEDKŮ	114
7. ABSTRAKT	116
8. PŘÍLOHA	117
8.1. Vliv provzdušňování kultivačního roztoku	117
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	118

1. PŘEDMLUVA

Zaplavenou půdu můžeme nalézt v mnoha přirozených stanovištích, ať již v nivách řek, mokřadech nebo v rašeliništích, avšak čím dál častěji vzniká také v zemědělsky upravovaných oblastech, zejména díky používání těžkých strojů. Ty způsobují zhutnění půdy, ve které se zmenšují póry pro vzduch a vodu, která tak nemůže protéci do hlubších vrstev a zůstává stát na povrchu půdy. Pro rostliny tak vzniká velice nepříznivé prostředí. Klesá obsah kyslíku, který se dýcháním rostlinných kořenů a mikroorganismů stává limitujícím faktorem k přežití - vznikají tzv. hypoxické podmínky. Se zvyšujícím se nedostatkem kyslíku se zvyšuje také obsah zplodin vznikajících při anaerobním dýchání a meziproduktů mikrobiálního uhlíkatého metabolismu. Snižuje se půdní redoxní potenciál, mění se pH a dochází k redukci a tím uvolnění některých prvků ze stabilních nerozpustných forem, které se tak stávají ve vyšším množství toxické. Některé rostliny po nástupu takovýchto podmínek velice rychle hynou, jiné v tomto prostředí dokáží přežít i delší dobu vytvářením různých mechanismů, ať již na úrovni metabolické, anatomické či morfologické.

Kukuřice (*Zea mays*) patří mezi modelové organizmy při výzkumu hypoxických podmínek. I když patří mezi rostliny, jež jsou velice citlivé na obsah kyslíku v rhizosféře, dokáže v těchto podmínkách určitou dobu přežít díky využívání hned několika obranných mechanismů. Z morfologických uveďme například tvorbu adventivních kořenů vyrůstajících v povrchových vrstvách půd. Ve velice krátkém časovém úseku indukuje také anatomické mechanismy, do nichž lze zařadit vznik aerenchymu - systému kanálů umožňujících vést kyslík z prýtu do kořene, a vytváření silnější exodermis blíže kořenové špičce - apoplastické bariéry pomáhající udržet kyslík uvnitř kořene.

Tato rostlina vytváří tzv. lyzigenní typ aerenchymu, který vzniká prostřednictvím programované buněčné smrti. Velice důležitou úlohu v tomto procesu hraje plynný fytohormon ethylen, který se účastní široké škály rozličných procesů během života rostlin. Je známo, že jeho biosyntéza je pozitivně ovlivnitelná auxinem, dalším velice důležitým členem ze skupiny fytohormonů, a světelnými podmínkami. Vliv těchto mechanismů na tvorbu aerenchymu prostřednictvím ethylenu však zatím nebyl příliš zkoumán.

1.1. Cíl diplomové práce

Vliv fytohormonů na anatomii hlavního kořene kukuřice seté (*Z. mays* L.), kultivaru Cefran s ohledem na tvorbu aerenchymu.

Dílčí cíle práce:

- Charakterizovat vliv exogenně dodaného auxinu (1-NAA) na tvorbu aerenchymu
- Charakterizovat vliv inhibitoru syntézy ethylenu (1-AOA) na tvorbu aerenchymu
- Zjistit, zda exogenně dodaný auxin (1-NAA) je schopen zvrátit inhibici tvorby aerenchymu (vyvolanou aplikací 1-AOA) v různých částech kořene
- Zjistit vztah mezi vlivem auxinu (1-NAA) a světelnými podmínkami na vznik aerenchymu
- Popsat další anatomické změny v kořeni po působení těchto látek

2. LITERÁRNÍ ÚVOD

2.1. Zaplavení, vznik hypoxických podmínek

Zaplavená půda se vyskytuje v přirozených ekosystémech jako jsou nivy řek, mokřady či rašeliniště (Voeselek *et al.*, 2003), avšak lze ji nalézt i v zemědělsky využívaných oblastech, kde má velký vliv především charakter půd. Zejména u jílovitých substrátů, kde jsou půdní póry příliš malé, snadno zaplnitelné vodou, a které nedovolují vodě protéci do hlubších vrstev, voda zůstává stát na jejich povrchu (Clark *et al.*, 1998). Čím dál častěji však tento jev vzniká lidskou činností díky těžké mechanizaci v zemědělství, kde dochází ke zhutnění půd a nedostatečnému odtoku při srážkách (Hlavatá, 1992).

Kyslík, který je rostlinami přijímán kořeny z půdy, je za normálních podmínek přístupný z atmosféry. Když jsou však půdní póry zalité vodou, jeho difúze je značně ztížena. Difúze plynů ve vodním prostředí je totiž až 10 000 krát nižší než na vzduchu (difúze $O_{2ve\ vzduchu} = 0,206\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$; $O_{2ve\ vodě} = 0,180\cdot 10^{-4}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$), (Kossaczky & Surový, 1972). Zejména při vyšších teplotách půdy, které stimulují dýchání kořenů rostlin a mikroorganismů (Drew *et al.*, 2000), dochází k velice rychlému vyčerpání kyslíku a ten se poté stává limitujícím faktorem k přežití (Drew, 1983). Postupem času tedy vznikají nejprve hypoxické (částečný nedostatek kyslíku) a poté až anoxické podmínky (úplná absence kyslíku). Ke vzniku těchto podmínek může dojít při zatopení již v hloubce několika centimetrů od povrchu půdy (Visser & Voeselek, 2004).

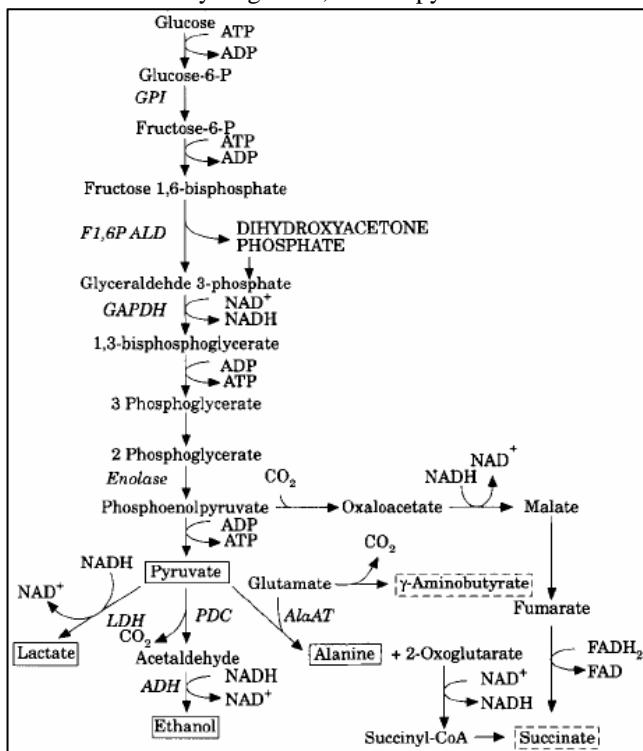
Rostliny však ohrožuje nejen samotný nedostatek kyslíku, velké nebezpečí pro rostliny představují i zplodiny vznikající při anaerobním dýchání kořenů a meziprodukty mikrobiálního uhlíkatého metabolismu (Drew, 1983). Snižuje se půdní redoxní potenciál, mění se pH a dochází k redukci některých prvků, jež se pak uvolňují ze stabilních nerozpustných forem a hromadí se v koncentracích, které jsou pro rostliny toxické (Jackson & Armstrong, 1999). Dochází k redukci železa, manganu a sulfátů, k hromadění H_2S či NO_2^- , k denitrifikaci nebo i k akumulaci krátkých organických kyselin (Armstrong *et al.*, 2000).

Rostliny reagují na zatopení i snížený obsah kyslíku, avšak stále není zcela zřejmé, jaké jsou mechanismy, kterými k tomuto vnímání dochází. Uvažuje se o vnímání prostřednictvím změn hladin ATP nebo například okyselení cytoplazmy (Drew, 1997;

Visser & Voeselek, 2004). Bylo však zjištěno, že po přijetí signálu o poklesu parciálního tlaku kyslíku v rhizosféře dochází již během několika minut k indukci syntézy ethyleny, jehož výzkumu při zatopení se věnuje velká pozornost (Peng *et al.*, 2001). Díky tomu, že ethylen je plyn, jenž lehce proniká vodním i lipidovým prostředím (Štěpánová & Alonso, 2005), může lehce opouštět místa své syntézy a ovlivňovat okolní pletiva a orgány, což je důležité pro indukci odpovědi rostlin na zatopení (Visser *et al.*, 1996). Na signalizaci se však podílejí i další faktory, i když přesný sled jednotlivých složek signální dráhy dosud není znám (viz též kap. 2.2.2.4.).

Za hypoxických podmínek parciální tlak kyslíku limituje produkci ATP a regeneraci NAD^+ a NADP^+ vytvářených oxidativní fosforylací na mitochondriální membráně (Dolferus *et al.*, 1997). Rostliny proto přepínají na alternativní fermentační dráhy, které zajišťují pokračování glykolýzy po delší dobu a umožňují regeneraci NAD^+ . Tyto dráhy však těží z každé molekuly glukózy o 30 ATP méně (Vartapetian & Jackson, 1997). Mezi hlavní fermentační produkty u vyšších rostlin se řadí ethanol, kyselina mléčná a v menším množství aminokyselina alanin (obr. 2.1). Všechny jsou odvozeny z konečného produktu glykolýzy, z pyruvátu. Vznik kyseliny mléčné je katalyzován enzymem laktát dehydrogenázou (LDH). Po určité době, zřejmě hromaděním kyseliny mléčné, dochází k acidifikaci cytoplazmy a rostliny přepínají na alkoholovou fermentaci s konečným produktem ethanol. Jde o dvoukrokový proces, jenž je katalyzovaný enzymy pyruvát dekarboxylázou (Dolferus *et al.*, 1997) a alkohol dehydrogenázou (ADH) (Dolferus *et al.*, 1997). U rostlin, které se neřadí mezi mokřadní, jako starček přímětník (*Senecio jacobaea*) či pomněnka rolní (*Myosotis arvensis*), se velice významně zvyšuje aktivita PDC již po 24 hodinách od vzniku hypoxických podmínek. Naopak u mokřadních rostlin, jako je starček vodní (*S. aquaticus*) nebo pomněnka bahenní (*M. palustris*), se tato

Obr. 2.1: Schéma metabolických cest při hypoxii (Dolferus *et al.*, 1997), GPI = glukóza-fosfát-izomeráza; F1-6P-ALD = fruktóza-1,6-fosfát aldoláza; GAPDH = glyceraldehid-3-fosfát dehydrogenáza; LDH = laktát dehydrogenáza; PDC = pyruvát



aktivita zvyšuje jen velice mírně (Albrecht & Biemelt, 1998). Při nedostatku kyslíku jsou vytvářeny vedle těchto uvedených enzymů ještě další proteiny převážně enzymy glykolýzy a fermentace, řadící se mezi tzv. anaerobní proteiny (ANPs). U kukuřice (*Zea mays*) jich bylo nalezeno dvacet (Vartapetian & Jackson, 1997; Subbaiah & Sachs, 2003).

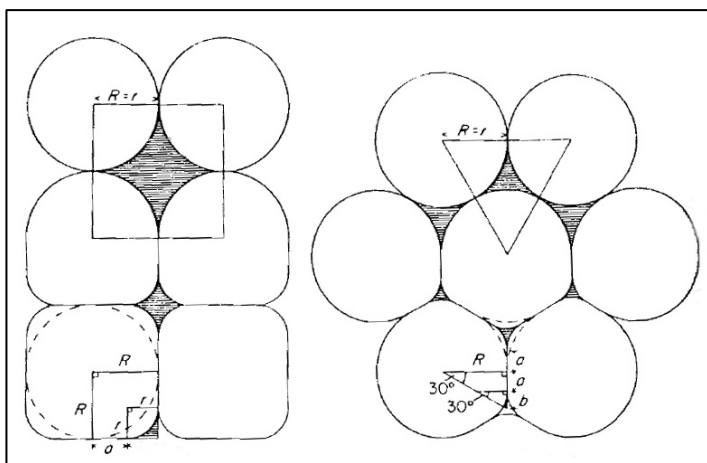
Nedostatek kyslíku v půdě je jedním z významných abiotických stresorů, který určuje distribuci druhů cévnatých rostlin a úspěch jednotlivých zemědělských plodin v mnoha částech světa. Z ekonomického i ekologického hlediska je nutné porozumět tomu, jak dochází k poškození rostlin v důsledku těchto faktorů a jaké jsou mechanismy adaptace rostlin (Vartapetian & Jackson, 1997).

2.2. Adaptace rostlin k hypoxii

Rezistence vůči zaplavení je zajišťována různými mechanismy, které lze řadit do tří skupin. Mezi morfologické patří tvorba povrchových adventivních kořenů či zvýšené prodlužování prýtu (Visser & Voeselek, 2004; Mano *et al.*, 2006). Druhou skupinou jsou anatomické mechanismy, do kterých můžeme zařadit jednak rozvoj exodermis s Casparyho proužky a suberinovou lamelou, jednak tvorbu speciálního pletiva, aerenchymu (Mano *et al.*, 2006; Enstone *et al.*, 2003). Metabolické pak zahrnují mechanismy umožňující snížení koncentrace vznikajícího ethanolu a akumulace kyseliny mléčné bránící okyselení cytoplazmy a mechanismy udržující adekvátní dodávky energie a cukrů (udržováním rychlosti glykolýzy a ethanolové fermentace), (Vartapetian & Jackson, 1997; Drew, 1997). Tyto adaptace se mohou vyvinout při určitém snížení dostupnosti kyslíku a vést k aklimaci (tzv. hypoxická aklimace k anoxii) a zvýšení odolnosti těchto pletiv při následném prohloubení hypoxie a vzniku anoxie. Některé buňky, ale i celé orgány, jsou pak schopné anoxické podmínky přežít týdny i měsíce bez poškození (Drew, 1997). Míra tolerance se však liší jednak mezi jednotlivými druhy rostlin (Dolferus *et al.*, 1997), jednak mezi buňkami jedné rostliny. Například buňky z oblasti kořenových špiček, jež jsou vysoce metabolicky aktivní, mohou přežít řádově desítky minut. Naproti tomu vakuolizované buňky z dospělých částí kořene vykazují mnohem vyšší odolnost.

2.2.1. Porozita kořenů

Různé odpovědi na zatopení a tolerance rostlin na tento druh stresu velice úzce souvisí s podílem porézních pletiv v kořeni. Porozita kořenů určuje účinnost vnitřního transportu kyslíku do ponořených pletiv (Sorrell *et al.*, 2000). Hlavním určujícím faktorem podílu kořenové porozity je vzájemné uspořádání buněk primární kůry (jejich těsnost a poměr porézních a neporézních pletiv). Porozitu ovlivňuje i typ a stupeň sekundárního růstu. Dvouděložné rostliny, které za normálních podmínek sekundárně tloustnou, potlačují tento růst nebo vytvářejí vysoce porézní feloderm (Justin & Armstrong, 1987). Uspořádání buněk primární kůry může být různé. Buňky mohou být uloženy jednak v radiálních řadách směřujících od středního válce k periferii kořene (**obr. 2.2, vlevo**), nebo radiální řady nevytvářejí a buňky následující vrstvy jsou vždy uloženy v místě styku buněk sousední vrstvy (**obr. 2.2, vpravo**). Kořeny s prvním popsáním typem uspořádání buněk primární kůry vykazují lepší ventilační potenciál. Poměr těchto dvou typů uspořádání může odrážet balancování mezi respiračními a mechanickými potřebami kořene (Justin & Armstrong, 1987).



Obr. 2.2: Schéma uspořádání buněk primární kůry kořene - buňky mohou být uloženy v radiálních řadách (vlevo) nebo mohou být vytvářené řady vůči sobě posunuté (vpravo) (Justin & Armstrong, 1987); zatmavené oblasti představují mezibuněčné prostory; r = poloměr zakřivení stěn obklopujících interceluláru, R = poloměr buňky v bodě styku s další buňkou, a = poloviční délka od bodu styku mezi každými dvěma buňkami

Rozdíly v anatomii, které poskytují tok většího množství kyslíku podél kořene a tím umožňují pokrytí požadavků pletiv na kyslík, dovolují kořenům druhů osídlujících hlubší vody či sedimenty s horší dostupností kyslíku růst do větších hloubek (Sorrell *et al.*, 2000; Justin & Armstrong, 1987).

2.2.2. Aerenchym

Aerenchym je parenchymatické pletivo s velkými mezibuněčnými prostory vyplněnými vzduchem, jejichž objem převyšuje objem vlastních buněk (Votrubová, 2001).

Aerenchym vytváří vnitřní provzdušňovací systém obsahující různě široké dutiny a kanály vedoucí z podzemních orgánů přes stonek do listů (Armstrong & Armstrong, 1990; Jackson & Armstrong, 1999; Drew *et al.*, 2000). Může se tvořit téměř ve všech částech rostlin - v prýtu a listech, ve střední primární kůře seminálních i adventivních kořenů a v oddencích (Shimamura *et al.*, 2007; Drew *et al.*, 2000). Rozsah aerenchymu se liší mezi druhy, mezi jednotlivými genotypy stejného druhu, mezi jednotlivými typy kořenů i podél samotného kořene (Kawai *et al.*, 1998; Colmer, 2003). Vzdálenost tvorby aerenchymu od vrcholu kořene souvisí s rychlostí jeho růstu, avšak závisí také na podmínkách prostředí (Soukup *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 1998).

Systém provzdušňovacích pletiv slouží k přivádění kyslíku až k meristemickým zónám kořene, a proto je jeho přítomnost v těchto místech kritická pro růst kořenů. Cesta transportu kyslíku je ovlivňována řadou faktorů, mezi něž se řadí délka cesty z prýtu, velikost radiálních ztrát z kořene do okolního média (ROL = radial oxygen loss), porozita pletiv a rychlost respirace buněk podél cesty. Difúze v oblasti vrcholů kořenů je omezena díky pevnému uspořádání buněk s nepatrnými mezibuněčnými prostory (Drew, 1983), početné dutiny v aerenchymu naopak snižují spotřebu kyslíku na jednotku plochy kořene (Armstrong & Armstrong, 1994; Drew *et al.*, 2000). Tento systém však slouží nejen k transportu plynů z atmosféry do kořenů, ale i opačným směrem. Je významnou cestou pro uvolňování některých plynů z rhizosféry do atmosféry, jako např. ethylenu, či methanu, ethanolu a/nebo CO₂, jež vznikají při anaerobním metabolismu (Colmer, 2003). Uvolňování methanu v zaplavených půdách rýžových polí není zanedbatelné. Tomuto plynu se věnuje čím dál větší pozornost, neboť jde o složku podílející se na globálním oteplování (Jackson & Armstrong, 1999; Evans, 2003). Přivádění kyslíku aerenchymem do kořene je velice důležité i z hlediska radiálních ztrát kyslíku z kořenů, které ovlivňují oxidaci sedimentu. Tím chrání rostlinu před vstupem fyto toxinů a podporují procesy, jako např. nitrifikaci (Jackson & Armstrong, 1999). Proti nadměrným ztrátám kyslíku z kořenů však rostliny vytvářejí různé mechanismy, kterými tyto ztráty regulují (kap. 2.3.2). U některých vodních rostlin může aerenchym sloužit i k nadlehčování rostlinných orgánů (Votrubová, 2001).

Mechanismus pohybu plynů uvnitř pletiv byl popsán jen u omezeného množství rostlin. Ve stoncích (stéblech) a oddencích rákosu (*Phragmites australis*) a některých dalších částečně zaplavených rostlin bylo vedle difúze prokázáno proudění hromadným tokem (Colmer, 2003; Armstrong & Armstrong, 1990). Difúze kyslíku podél kořene závisí na mnoha faktorech, jako například na porozitě pletiv kořene, na počtu vrstev primární

kůry, na přítomnosti či nepřítomnosti apoplastických bariér (Justin & Armstrong, 1987; Sorrell *et al.*, 2000) a nebo například na tloušťce kořenů a množství postranních kořenů (Aguilar *et al.*, 1999). Míra hromadného toku je určena schopností vytvořit pozitivní tlak v prýtu a průchodností aerenchymatických pletiv, avšak záleží také na podmínkách prostředí obklopujícího rostlinu, konkrétně na gradientu vlhkosti a teploty kolem listů rostlin (Colmer, 2003). Vedení hromadným tokem je velice rychlé na světlo, když jsou otevřené průduchy a zejména při nízké vlhkosti vzduchu (Armstrong & Armstrong, 1990).

2.2.2.1. Typy aerenchymu

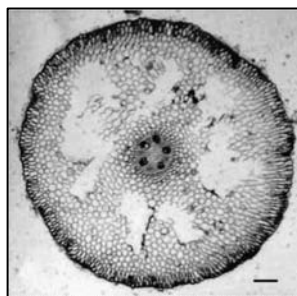
Vznik aerenchymu je druhově specifický a tradičně bývají rozlišovány dva typy aerenchymu - schizogenní a lyzigenní. V literatuře však lze nalézt ještě další typ, tzv. rhexigenní aerenchym. Ten vzniká potrháním pletiva, ke kterému dochází následkem nerovnoměrného růstu jednotlivých buněk v pletivu (Votrubová, 2001). V posledních letech se tradiční dělení ještě rozšířilo o další typ aerenchymu, tzv. expanzigenní. Toto rozdělení je použito i v následujících podkapitolách.

Alternativní rozdělení vytvořil Justin *et al.*, (1987). Uspořádal typy aerenchymu do čtyř skupin, které nazval podle jejich typických zástupců. První skupinu nazval Gramineous a zařadil do ní zástupce řádu Poales, jako např. rákos (*Phragmites*), zblochan (*Glyceria*) a bezkolonec (*Molinia*). Díky svému uspořádání aerenchymu však do této skupiny patří i sítina (*Juncus*) a orobinec (*Typha*). Druhá skupina s názvem Cyperaceous zahrnuje zástupce čeledi Cyperaceae. Tyto dvě skupiny tvoří aerenchym pomocí oddálení buněk a jejich následné destrukce. Další dvě skupiny nesou název Apium a Rumex, u nichž aerenchym vzniká pouhým oddělením buněk. Toto dělení se však v literatuře příliš neujalo.

2.2.2.1.1 Schizogenní aerenchym

Tento typ aerenchymu vychází z rozdílného dělení a zvětšování určitých buněk primární kůry. Poté dochází k jejich oddálení a tím k vytvoření uspořádaných mezer (Evans, 2003). Schizogenní aerenchym se vyskytuje u mnoha mokřadních druhů rostlin po celém světě (**obr. 2.3**), ale byl nalezen i

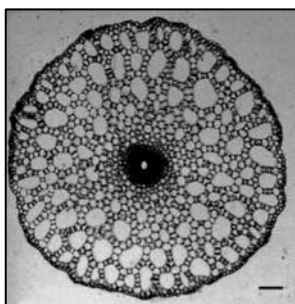
Obr. 2.3: Schizogenní aerenchym v adventivním kořenu blatouchu (*Caltha palustris*) (Visser *et al.*, 2000); příčný řez, úsečka = 0,1mm



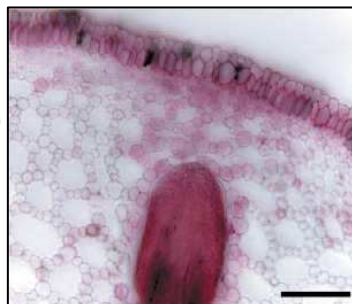
u některých suchozemských rostlin. Tento typ je dobře prostudován u mnoha druhů rostlin na morfologické i ultrastrukturální úrovni, avšak o jeho regulaci během vývoje zatím mnoho není známo (Jackson & Armstrong, 1999; Evans, 2003).

2.2.2.1.2 Expanzigenní aerenchym

V roce 2005 Seago *et al.* vyčlenili další typ aerenchymu. Jeho vznik začíná schizogenní tvorbou mezibuněčných prostor, která je následována buněčným dělením a selektivní expanzí pouze těch buněčných stěn, které lemují lakuny. Dochází tedy k jakémusi nerovnoměrnému růstu buněk. Vzniklý aerenchym na průřezu připomíná včelí plástev (Seago *et al.*, 2000b). Nachází se u šřovíku (*Rumex palustris*), (Justin & Armstrong, 1987), (**obr. 2.4**) leknínu (*Nymphaea odorata*), (Seago *et al.*, 2000b), fylogeneticky blízkého puškvorce (*Acorus calamus*), (Soukup *et al.*, 2005), (**obr. 2.5**), vrbovky (*Epilobium hirsutum*), (Armstrong & Armstrong, 1994) nebo ve vnějších vrstvách primární kůry mokřadní rostliny modrásky (*Pontederia cordata*), (Seago *et al.*, 2000a).

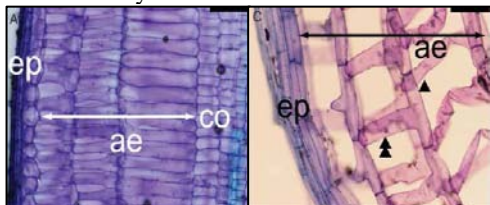


Obr. 2.4: Expanzigenní aerenchym
v adventivním kořenu šřovíku (*Rumex palustris*) (Visser *et al.*, 2000); příčný řez, úsečka = 0,1mm



Obr. 2.5: Expanzigenní aerenchym
v adventivním kořenu puškvorce (*Acorus calamus*) (Soukup *et al.*, 2005); příčný řez; barveno Sudan Red 7B; úsečka = 100µm

Obr. 2.6: Expanzigenní aerenchym lufy (*Luffa cylindrica*) (Shimamura *et al.*, 2007). A) hypokotyl, úsečka=0,2mm. B) adventivní kořen úsečka=0,1mm; podélný řez; co=primární kůra, ep=rhizodermis, ae=aerenchym

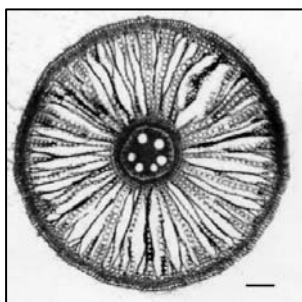


Zvláštní pozornost zaslouží vývoj aerenchymu u jednoleté zeleniny lufy (*Luffa cylindrica*), (Shimamura *et al.*, 2007), která za normálních podmínek aerenchym netvoří, avšak jakmile poklesne hladina kyslíku v rhizosféře, vytváří se v nově vznikajících AK a hypokotylu rozsáhlé oblasti aerenchymu. Tento aerenchym lze řadit do výše zmíněné skupiny, avšak jeho vznik se od ostatních rostlin zcela odlišuje. Jeho buňky se neprotahují v podélném směru, ale dutiny vznikají protažením buněk ve směru radiálním. Dokonce i mezi aerenchymem v AK a v hypokotylu jsou rozdíly. V hypokotylu se buňky protahují

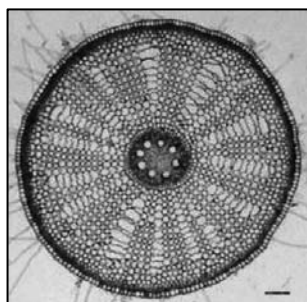
radiálně směrem k povrchu kořene (**obr. 2.6, A**), avšak v AK dochází k protažení buněk do tvaru písmene „T“ (**obr. 2.6, B**). Navíc je tento aerenchym zajímavý i tím, že se začíná tvořit ve vnějších vrstvách primární kůry, bezprostředně pod epidermis a v hlavních kořenech nevzniká vůbec (Shimamura *et al.*, 2007).

2.2.2.1.3 Lyzigenní aerenchym

Při vzniku tohoto typu aerenchymu dochází ke stejnoměrnému růstu všech buněk primární kůry a následné buněčné smrti pouze některých z nich (Evans, 2003). Oproti schizogennímu aerenchymu je tento typ méně uspořádaným systémem, jehož vývoj se liší u jednotlivých rostlin.



Obr. 2.7: Lyzigenní aerenchym v adventivním kořenu sítiny (*Juncus effusus*) (Visser *et al.*, 2000); příčný řez, úsečka = 0,1mm

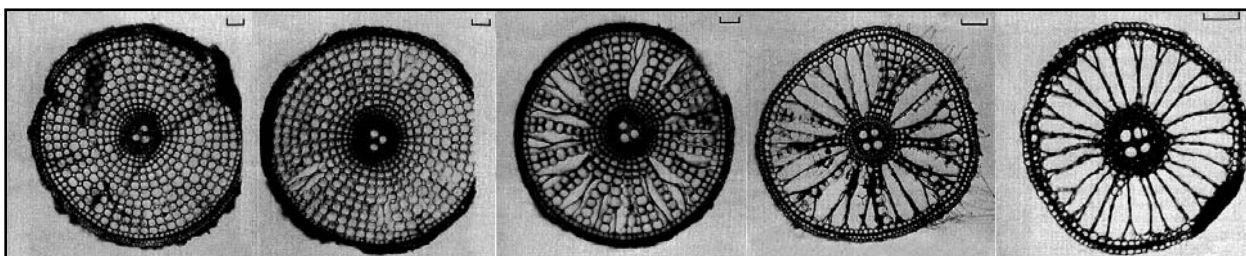


Obr. 2.8: Lyzigenní aerenchym v adventivním kořenu ostřice (*Carex acuta*) (Visser *et al.*, 2000); příčný řez, úsečka = 0,1mm

U Poales, jako např. u bezkolence (*Molinia coerulea*), (Justin & Armstrong, 1987), rákosu (*Phragmites australis*), (Soukup *et al.*, 2002) či zblochanu (*Glyceria maxima*), (Lichtenberková, 2002), probíhá vznik lyzigenních dutin kolapsem řady buněk v radiálním směru. Radiální buněčné stěny zůstávají částečně intaktní. Interceluláry prodloužené v tomto směru byly pozorovány i u rýže (*Oryza sativa*), orobince (*Typha angustifolia*), sítiny (*Juncus effusus*) (Justin & Armstrong, 1991a; Armstrong & Armstrong, 1994; Lichtenberková, 2002; Mano *et al.*, 2006) a kukuřice (*Zea mays*), kde dochází k rozšiřování intercelulár nejen radiálním, ale i tangenciálním směrem (Justin & Armstrong, 1987). Na příčném řezu toto uspořádání připomíná drátěné kolo (Evans, 2003), (**obr. 2.7**). Naopak u Cyperaceae, např. u ostřice (*Carex acuta*) či skřípiny (*Scirpus sylvaticus*), větší část radiálních stěn mizí a ve směru obvodu kořene, tedy v tangenciálním směru, jsou viditelné zbytky buněčných stěn. Takto vzniká aerenchym, jenž připomíná tvarem pavoučí síť (Lichtenberková, 2002), (**obr. 2.8**).

Buněčný kolaps v kořenech rýže (*O. sativa*) začíná ve specifické pozici ve střední primární kůře. Buňky jsou v tomto místě kratší v podélném směru a širší v radiálním směru než ostatní buňky primární kůry. Poté následuje rozšiřování lakun v radiálním směru a to směrem ven i ke středu kořene (Kawai *et al.*, 1998), (**obr. 2.9**). Díky ustálenému uspořádání buněk primární kůry kořene rýže (*O. sativa*) lze pomocí neutrální červeně a Evansovy modři určit, v jaké vrstvě tento proces začíná (Kawai *et al.*, 1998). K identifikaci buněk předurčených k PCD lze použít TUNEL reakci. Tato reakce byla vyzkoušena na kukuřici (*Z. mays*), avšak díky jejímu neustálenému uspořádání buněk primární kůry není prozatím tato detekce příliš úspěšná (Gunawardena *et al.*, 2001).

Obr. 2.9: Vznik lyzigenního aerenchymu při hypoxii v adventivních kořenech rýže (*Oryza sativa*). Aerenchym se začíná vyvíjet v jednom místě a postupuje oběma směry (Justin & Armstrong, 1991a); příčné řezy v různé vzdálenosti od vrcholu kořene, úsečka = 0,1 mm.



Při tvorbě tohoto typu aerenchymu však neumírají všechny buňky primární kůry. Pokusy s adventivními kořeny rostlin rákosu (*P. australis*), rýže (*O. sativa*) a kukuřice (*Z. mays*) doložily, že pruhy intaktních buněk jsou živé, neboť tyto kořeny po ozáření dokázaly syntetizovat chlorofyl (Armstrong & Armstrong, 1994). Pruhy živých buněk táhnoucí se napříč celou primární kůrou jsou důležité pro udržení strukturální celistvosti kořene a pro apoplastický i symplastický transport látek (Evans, 2003).

Oproti schizogennímu typu je tento aerenchym více prostudován na buněčné úrovni, avšak procesy regulace během vývoje zůstávají zatím nevyjasněné (Evans, 2003). Ještě před deseti lety nebylo příliš zřejmé, jakým mechanismem je zajištěna buněčná smrt při vzniku tohoto typu aerenchymu. Jednou z navrhovaných hypotéz bylo, že odumírání určitých buněk se děje pomocí programované buněčné smrti (PCD = programmed cell death), geneticky kódovaným aktivním procesem, který je součástí běžného života rostlin, při němž buňky organizují svoji vlastní destrukci (Gunawardena, 2008; Mergemann & Sauter, 2000). Jiná hypotéza se týkala odumírání buněk pomocí nekrózy, ve které vnější agens, např. toxin, iniciuje degeneraci, jež obvykle začíná v plazmatické membráně (Drew,

1997). V současnosti existují důkazy, které se přiklání spíše na stranu PCD (Gunawardena *et al.*, 2001; Gunawardena, 2008).

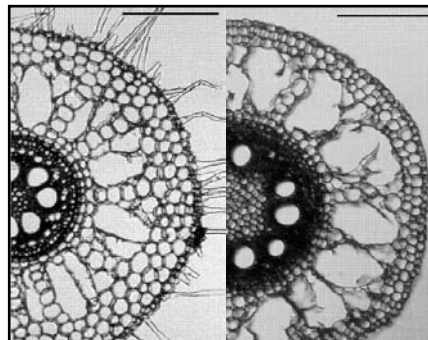
U kukuřice (*Z. mays*) a rýže (*O. sativa*) jsou první známky buněčné smrti na ultrastrukturální úrovni pozorovány jako prasknutí tonoplastu, vylití hydrolytických enzymů a okyselení cytoplazmy. Vakuola je následně zaplněna granulárním materiálem. Poté dochází k mnoha invaginacím plazmatické membrány a cytoplazma obsahuje početné množství malých váčků, které fúzí s vakuolou. Mitochondrie a endoplazmatické retikulum jsou v této fázi dobře rozpoznatelné a intaktní. Předposledním krokem je oddělení plazmatické membrány od buněčné stěny. Nakonec degeneruje i buněčná stěna (Campbell & Drew, 1983; Kawai *et al.*, 1998; Gunawardena *et al.*, 2001; Lenochová, 2004).

Schizogenní, expanzigenní i lyzigenní typ aerenchymu se mohou různě kombinovat a také mohou mít různé zastoupení v různých orgánech téže rostliny (Jackson & Armstrong, 1999). Například u pryskyřníku (*Ranunculus sceleratus*), (Visser *et al.*, 2000) a blatouchu (*Caltha palustris*) dochází po vzniku schizogenního aerenchymu k vytváření širších nepravidelných lyzigenních dutin. Tento typ bývá označován jako schizo-lyzigenní (Visser *et al.*, 2000).

2.2.2.2. Konstitutivní a indukovaný vznik aerenchymu

Vznik aerenchymu může být konstitutivní, tedy řízený geneticky, nebo může být indukovatelný vnějšími faktory. Konstitutivní vznik aerenchymu byl popsán u většiny mokřadních rostlin, u druhu příbuzného kukuřici *Tripsacum dactyloides* (Clark *et al.*, 1998) a teosinte (*Zea luxurians*, *Z. nicaraguensis*), (Mano *et al.*, 2006), rýže (*Oryza sativa*), (Colmer *et al.*, 1998), banánovníku (*Musa spp.*), (Aguilar *et al.*, 1999) nebo voďanky (*Hydrocharis morsus-ranae*), (Seago *et al.*, 1999b). I když se tento aerenchym nachází v rostlinách i za normálních podmínek, jakmile dojde v půdě ke snížení obsahu kyslíku, reagují rostliny většinou dalším zvýšením své porozity (Visser *et al.*, 2000), (**obr. 2.10**). Rozdíl se vyskytují i mezi jednotlivými genotypy rýže (*O. sativa*), (Colmer *et*

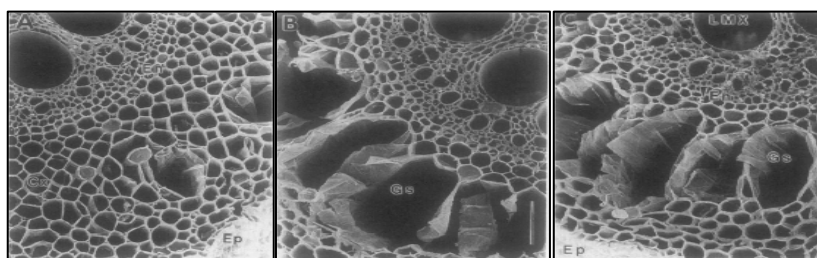
Obr. 2.10: Konstitutivní aerenchym za normálních podmínek (vlevo) a při dvoutýdenním zaplavení (vpravo) u teosinte (*Zea nicaraguensis*); příčný řez, úsečka = 0,25mm (Mano *et al.*, 2006)



al., 1998). Naproti tomu u některých obilnin, jako kukuřice (*Z. mays*), pšenice (*Triticum aestivum*), ječmene (*Hordeum vulgare*) a některých dvouděložných rostlin se aerenchym vytváří až například po snížení obsahu kyslíku v půdě při zatopení, a proto je vznik takového typu aerenchymu popisován jako indukovaný (Drew *et al.*, 2000; Mano *et al.*, 2006).

2.2.2.3. Vnitřní a vnější podněty pro tvorbu indukovaného aerenchymu

Ještě ve 40. letech minulého století se myslelo, že tvorba aerenchymu je způsobena vlivem nedostatku kyslíku na životnost buněk primární kůry (McPherson, 1939). V průběhu času však tyto mylné názory vyvrátily práce s exogenní aplikací ethylenu k nestresovaným kořenům (He *et al.*, 1996b). Ethylen, ať již endogenní, či exogenně dodaný, působí jako článek signální dráhy vedoucí k indukci tvorby aerenchymu (Gunawardena *et al.*, 2001). Vnějšími podněty mohou být abiotické stresy jako zatopení (způsobující hypoxické podmínky) nebo také sucho či vysoká teplota (Evans, 2003). Tvorbu aerenchymu může indukovat také mechanický odpor půdy (Clark *et al.*, 1998). Bylo zjištěno, že hypoxie a mechanický odpor půdy podporují biosyntézu ethylenu, avšak zřejmě odlišnými mechanismy. Synergicky působí na aktivitu ACC syntázy (He *et al.*, 1996a), (viz kap. 2.5.). Dalším podnětem pro tvorbu aerenchymu u kukuřice (*Zea mays*) může být nedostatek živin, zejména dusíkatých látek (nitrátu i amoniaku), (Kubica & Baluška, 1989) a fosfátů (He *et al.*, 1992), (**obr. 2.11**). Tento vliv dusíkatých látek byl potvrzen i u rákosu (*Phragmites australis*), (Erhart, 2000). U druhého páru AK kukuřice (*Z. mays*) byl pozorován i vliv deficiencie sulfátu (Bouranis *et al.*, 2006). Nedostatek živin však překvapivě nepůsobí zvýšení syntézy ethylenu, ba spíše naopak (He *et al.*, 1994). Díky pokusům s aplikací inhibitorů syntézy a účinku ethylenu (AVG a Ag^+) bylo zjištěno, že nedostatek živin způsobuje vyšší citlivost pletiv k tomuto hormonu. Zda je zvýšení citlivosti způsobené zvýšením počtu receptorů pro ethylen či zesílením jejich afinity, není známo (He *et al.*, 1992).



Obr. 2.11: Vývoj aerenchymu v adventivních kořenech kukuřice (*Zea mays*), snímky příčných řezů ze skenovacího elektronového mikroskopu (He *et al.*, 1992); úsečka = 100 μ m; (A) kontrola; (B) kořeny pěstované při nedostatku dusíkatých látek; (C) při nedostatku fosfátů.

2.2.2.4. Podrobnější analýza tvorby lyzigenního aerenchymu při hypoxii

Za hypoxických podmínek dochází k indukci aktivity enzymu ACC syntázy. Poslední krok katalyzovaný enzymem ACC oxidázou však vyžaduje určité množství kyslíku. To vysvětluje skutečnost, proč se za zcela anaerobních podmínek nemůže tvořit aerenchym (He *et al.*, 1996b), (viz kap. 2.5.). Přes velkou pozornost věnovanou roli ethylenu při tvorbě lyzigenního aerenchymu však zůstává otázkou, zda cílem pro ethylen jsou buňky, které následně odumírají, nebo jejich okolní sousedé (Jackson & Armstrong, 1999). U suspenzních kultur kukuřice (*Zea mays*) bylo zjištěno, že na syntézu ethylenu navazuje zvýšení koncentrace cytoplazmatického vápníku indukujícího PCD. To je způsobeno zejména uvolňováním z vnitřních zásobáren, pravděpodobně z mitochondrií, k čemuž dochází 1 - 2 minuty po vzniku hypoxie (Subbaiah *et al.*, 1994). Látky, které zvyšují obsah cytosolického vápníku tím, že indukují jeho vylití z vnitrobuněčných zásob, např. thapsigargin a kofein, podporují též buněčnou smrt. Signál o nedostatku kyslíku v pletivech huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) zprostředkovává vedle vápníku též peroxid vodíku, a to zvýšením aktivity ADH (alkohol dehydrogenázy), (Baxter-Burrell *et al.*, 2002).

Nástup hypoxických podmínek po zaplavení způsobuje vedle produkce ethylenu též aktivaci enzymů a regulačních proteinů degradujících/rozvolňujících buněčnou stěnu, což má za následek změny v jejich růstovém vzorci. Mezi tyto proteiny patří např. expanziny, pektinázy, xylanázy, celulózy a xyloglukan endo-transglykosylázy (Jackson & Armstrong, 1999; Bragina *et al.*, 2003; Subbaiah & Sachs, 2003). Aktivita pektináz a xylanáz se zvyšuje relativně rychle po nástupu hypoxie, kdežto aktivita celuláz s určitým zpožděním (Bragina *et al.*, 2003). Například v AK kukuřice (*Z. mays*) došlo k zvýšení aktivity celuláz dva dny po zvýšení aktivity ACC syntázy (He *et al.*, 1994).

Na téma vzniku a vývoje lyzigenního aerenchymu existuje v současnosti mnoho nevyjasněných, a přitom klíčových otázek. Stále se neví, jakým způsobem jsou „vybírány“ buňky, které odumírají, jakým mechanismem jsou chráněny pruhy živých buněk před lytickými enzymy vylitými z mrtvých buněk, co limituje šíření těchto enzymů (Justin & Armstrong, 1987) a nebo například proč PCD obvykle neovlivňuje vnitřní a vnější parenchymatické vrstvy primární kůry (Visser & Voesenek, 2004). Otázkou zůstává i to, jaké jsou rozdíly mezi PCD, jež probíhá u rostlin, oproti živočišné PCD, a pokud jde skutečně o PCD, co se děje se zbytky mrtvých buněčných stěn, když v rostlinách neexistují

žádné fagocyty či makrofágy a rostliny ani nemají žádný cirkulační systém k vynesení zbytků (Evans, 2003). Taktéž zůstávají nejasné funkční rozdíly v transportu plynů mezi různými typy aerenchymu. Skutečnost, že při vývoji schizogenního a expanzigenního aerenchymu neodumírají buňky, nahrává myšlence, že může mít tento aerenchym vyšší odpor k transportu a že více prodýchává na jednotku objemu pletiva. Podle této hypotézy by kořeny se schizogenním typem aerenchymu v kořenech měly kořenit mělčeji než kořeny s lyzigenním typem aerenchymu, avšak velice záleží na podmínkách prostředí (Armstrong *et al.*, 1999).

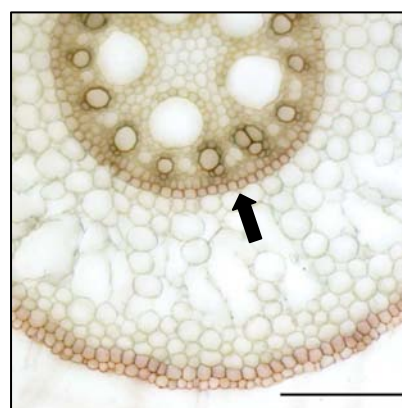
2.3. Apoplastické bariéry

2.3.1. Endodermis

Endodermis je obecně přítomná apoplastická bariéra nacházející se prakticky ve všech kořenech semenných rostlin a velké části výtrusných rostlin (Enstone *et al.*, 2003). Tvoří vnitřní vrstvu primární kůry kořene a s její funkcí je spojený typický znak - vytváření Casparyho proužků. Jedná se o modifikaci buněčné stěny v antiklinálních stěnách buněk, kde dochází k těsné asociaci plazmatické membrány a buněčné stěny, jež se neodlučují ani v průběhu plazmolýzy (vzniká jev, který se nazývá pásková plazmolýza, *band plasmolysis*), (Peterson, 1989).

U některých druhů rostlin se vyskytuje pouze ve stádiu Casparyho proužků, jako je tomu například u modrásky (*Pontederia cordata*), (Seago *et al.*, 2000a), leknínu (*Nymphaea odorata*), blatouchu (*Caltha palustris*), (Seago *et al.*, 2000b), vodňanky (*Hydrocharis morsus-ranae*), (Seago *et al.*, 1999b) či puškvorce (*Acorus calamus*), (Soukup *et al.*, 2005). U většiny druhů však dochází během vývoje kořene k jejím dalším modifikacím. Nejprve se tvoří suberinová lamela (tzv. stádium II.) a následně může docházet k sekundárnímu tloušťnutí buněčné stěny (tzv. stádium III.), která může lignifikovat. Modifikace buněčných stěn endodermis ve třetím stádiu nejsou rovnoměrné. Obvykle je nejvíce ztloustlá vnitřní tangenciální stěna, radiální stěny jsou nejtlustší tam, kde s ní sousedí a směrem k vnějším tangenciálním stěnám jejich tloušťky ubývá. Vnější

Obr. 2.12: Endodermis ve stádiu III., kukuřice (*Zea mays*), příčný ruční řez bázi kořene, barveno Floroglucinolem, orig., úsečka = 100 μ m



tangenciální stěna je neztloustlá, což na příčném řezu připomíná svým tvarem písmeno „U“ (**obr. 2.12**), (Esau, 1965; Enstone *et al.*, 2003).

Endodermis v místě Casparyho proužků může obsahovat lignin či jemu podobné polymery a různé množství suberinu, jenž je díky svému lipidickému složení zodpovědný za hydrofóbní charakter bariéry (Schreiber *et al.*, 1999; Zeier *et al.*, 1999). Složení jednotlivých biopolymerů závisí na druhu rostliny, mění se v závislosti na vývojovém stádiu endodermis a je ovlivněno i působením rozličných stresů (viz kapitola 2.3.2.2.).

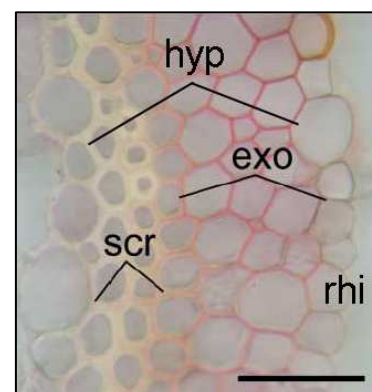
Zřejmě nejdůležitější funkcí Casparyho proužků v endodermis je bránit volnému pohybu látek z apoplastu primární kůry do apoplastu středního válce a naopak zabraňovat jejich zpětnému toku z apoplastu středního válce do apoplastu primární kůry. Suberinová lamela zesiluje funkci primární bariéry, má důležitou funkci při vodním režimu, například při stresu suchem, brání vstupu patogenů nebo například toxických látek z prostředí. Odhaduje se, že ztloustlá sekundární buněčná stěna má také funkci mechanickou (Enstone *et al.*, 2003). Na správnost těchto hypotéz ukazují i data získaná sledováním rostlin vytvářejících během svého života endodermis pouze ve stádiu I. U modrásky (*P. cordata*) nebo voďanky (*H. morsus-ranae*) je kompenzována absence sekundární stěny zesílením primární buněčné stěny buněk ležících ve vnitřní primární kůře (Seago *et al.*, 1999b; Seago *et al.*, 2000a). U leknínu (*N. odorata*) roli mechanické opory ve vnitřní primární kůře zastupují lignifikované sklereidy primární kůry (Seago *et al.*, 2000b). Naopak u orobince (*Typha angustifolia* i *T. glauca*) se endodermis vyvíjí během růstu do stádia III. a kořeny tudíž nevytvářejí ve své primární kůře žádné ztlustliny (Seago *et al.*, 1999a).

2.3.2. Exodermis

Další apoplastickou bariérou v kořenech je exodermis, která může tvořit hypodermis nebo být její součástí. Hypodermis tvoří část primární kůry pod rhizodermis, která se charakterem svých buněk odlišuje od hlubších vrstev primární kůry. U několika málo druhů zůstává hypodermis po celou dobu života rostlin nemodifikovaná suberinem či ligninem, jak lze pozorovat u rostlin z čeledi Geraniaceae, jako je muškát (*Pelargonium peltatum*), nebo u některých druhů z čeledi Poaceae, mezi něž patří oves (*Avena sativa*), kostřava (*Festuca ovina*), lipnice (*Poa annua*, *P. pratensis*), pšenice (*Triticum aestivum*), (Perumalla *et al.*, 1990b) a též u třešně (*Prunus avium*), (Soukup *et al.*, 2004). Od ostatních buněk primární kůry ji však lze dobře rozlišit podle odlišného, na příčném řezu

hexagonálního, tvaru buněk. Dobře rozeznatelná je i podle těsného uspořádání buněk s velmi malými intercelulárami, jako je tomu např. u blatouchu (*Caltha palustris*), (Visser et al., 2000), nebo dokonce s chybějícími mezibuněčnými prostory. Hypodermis může být jednovrstevná i vícevrstevná a v kořenech většiny rostlin je buď totožná s exodermis nebo je exodermis její důležitou součástí například spolu se sklerenchymatickým prstencem, jako například u rýže (*Oryza sativa*), (Schreiber et al., 2005), rákosu (*Phragmites australis*), (Soukup et al., 2007) či ostřice (*Carex gracilis*), (Lichtenberková, 2002), (**obr. 2.13**).

Obr. 2.13: Hypodermis, příčný řez bází kořene rákosu (*Phragmites australis*), (Soukup et al., 2007), modifikováno, barveno Sudan Red 7B, úsečka = 50 μm, **scr**-sklerenchymatický prstenec, **exo**-exodermis, **hyp**-hypodermis, **rhi**-rhizodermis

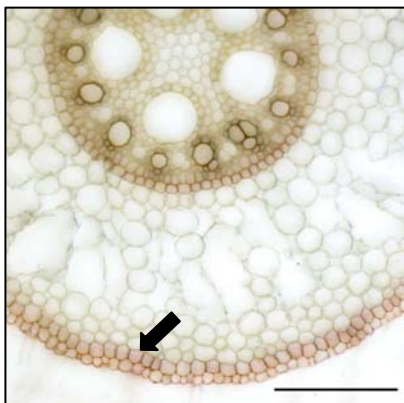


Exodermis se vyskytuje v kořenech většiny krytosemenných rostlin (Enstone et al., 2003), u některých se nachází i v oddencích (Perumalla et al., 1990a). Je přítomna u hydrofytních, mezofytních i xerofytních druhů, členů primitivních i vývojově mladších čeledí (Perumalla et al., 1990b). Přítomnost exodermis se může lišit i podle typu kořene, jak lze pozorovat u ječmene (*Hordeum vulgare*), kde v seminálních a první generace nodálních kořenů se tato vrstva nevytváří a objevuje se až v dalších generacích nodálních kořenů (Lehmann et al., 2000).

Již Haberlandt, (1965) pozoroval, že exodermis se od ostatních buněk hypodermis odlišuje přítomností suberinu ve svých buněčných stěnách, což je klíčové pro její roli apoplastické bariéry podobně jako u endodermis. Peterson, et al. (1989) zjistili, že u všech vrstev, které jsou suberinizované jsou vytvářeny Casparyho proužky, avšak ve srovnání s endodermis jsou širší a velice rychle jsou překrývány suberinovou lamelou (Seago et al., 2000a; Soukup et al., 2002).

Exodermis je podle typu buněk členěna na dvě skupiny (Peterson, 1989). Do první skupiny patří uniformní exodermis, která je tvořena jedním typem buněk. Mezi zástupce této skupiny patří kukuřice (*Zea mays*), (**obr. 2.14**) nebo rákos (*P. australis*), (Soukup et al., 2002) a u orobince (*Typha angustifolia*, *T. glauca*) je vytvářena vícevrstevná exodermis (Seago et al., 1999a; Peterson, 1989). Ve druhé skupině tvoří rostliny exodermis, jež se vyznačuje přítomností dvou typů střídajících se buněk. Jednak jsou zde dlouhé suberinizované buňky, jednak krátké, tzv. propustné buňky (podle von Guttenberga nazvané Durchlasszellen), (von Guttenberg, 1968). U nich je zpožděna depozice suberinové lamely a slouží zřejmě pro průchod vody a iontů živin. Tento typ exodermis byl

Obr. 2.14: Exodermis kukuřice (*Zea mays*), příčný ruční řez báží kořene, barveno Floroglucinolem, orig., úsečka=100 μ m



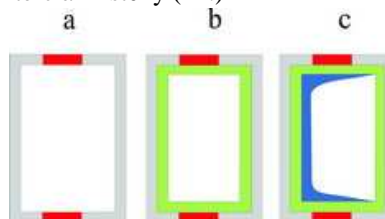
nalezen u cibule (*Allium cepa*), (Peterson, 1989), puškvorce (*Acorus calamus*), (Soukup *et al.*, 2005), často se vyskytuje u xerofytních rostlin a byl nalezen i u vzdušných kořenů orchidejí (Peterson & Perumalla, 1990).

Výzkum exodermálních Casparyho proužků se plně rozvinul až v 80. letech minulého století. Diagnostickým znakem je (podobně jako u endodermis) přítomnost zvlněných buněčných stěn v místě Casparyho proužku na podélném řezu exodermis. Pro určení výskytu

Casparyho proužků se však častěji používá detekce suberinu, který se zdá být velice dobrým indikátorem jejich přítomnosti (Peterson & Perumalla, 1990). U zblochanu (*Glyceria maxima*) nebyl histochemickým barvením zjištěn žádný suberin, proto byl vysloven závěr, že u tohoto druhu není exodermis vytvářena (Lichtenberková, 2002). Avšak později byl biochemicky detekován lipidický materiál v buněčných stěnách buněk hypodermis. Vyvstává tedy otázka, zda dosud používané histochemické metody jsou postačující a zda u těch druhů, u kterých byla popsána absence exodermis, skutečně tato bariéra chybí, nebo jen nebyla zatím zjištěna (Soukup *et al.*, 2007). Při studiu apoplastických bariér se můžeme často v literatuře setkat s označením RHCW (popř. ECW). Rhizodermální buněčná stěna je odolná k degradačním enzymům, a tudíž ji lze jen stěží mechanicky oddělit od buněčných stěn hypodermis. Proto preparáty apoplastických bariér izolovaných z vnějšího povrchu kořene bývají sledovány jako celek, jež je nazýván **rhizo- and exodermal cell walls** (RHCW). Podobně vzorky endodermálních buněčných stěn jsou nazývány **endodermal cell walls** (ECW), (Schreiber *et al.*, 2007; Zeier *et al.*, 1999). Chemické složení exodermální vrstvy je podobné endodermální vrstvě co do typu látek, které se v ní vyskytují (viz kap. 2.3.1.), ale konkrétní složení se může dosti lišit, jak ukazuje kap. 2.3.2.2.

Časně po skončení vývoje Casparyho proužků (**obr. 2.15a, červená**), nebo ještě v jeho průběhu (Seago *et al.*, 2000a), se vytváří suberinová lamela (**obr. 2.15b, zelená**). U orobince (*T. angustifolia*, *T. glauca*) je tvorba Casparyho proužků dokonce zpožděna až do chvíle, než

Obr. 2.15: Schéma vývoje endodermis, (Seago *et al.*, 1999b), modifikováno; a) stádium Casparyho proužků (I.), b) stádium suberinové lamely (II.), c) stádium terciární stěny (III.)



se objeví ve vnitřních vrstvách exodermis suberinová lamela (Seago *et al.*, 1999a). Jako u endodermis může docházet k ukládání sekundární stěny (**obr. 2.15c, modrá**), (Hose *et al.*, 2001). Vzdálenost, ve které probíhají modifikace apoplastických bariér od kořenové špičky, je různá a závisí na rychlosti růstu kořene. U mnohých rostlin se diferencuje ve větší vzdálenosti než endodermis, nicméně u mokřadních rostlin se vytváří naopak velice blízko kořenové špičky, jak bylo pozorováno například u orobince (*T. angustifolia*, *T. glauca*), (Seago *et al.*, 1999a), avšak tato pozice není neměnná (viz dále), (Soukup *et al.*, 2004). Vytváření exodermis dokonce ještě před začátkem tvorby endodermis je zřejmě obecným znakem mokřadních rostlin (Soukup *et al.*, 2002; Lichtenberková, 2002).

Jednou z velice důležitých funkcí exodermis je pomáhat zaplaveným rostlinám snižovat ztráty kyslíku do okolní půdy (tzv. ROL = **r**adial **o**xxygen **l**oss), čímž se i zesiluje transport kyslíku podél kořene (Enstone *et al.*, 2003; Enstone & Peterson, 2005; Armstrong *et al.*, 2000). Další neméně důležitou funkcí je po zaplavení omezování vstupu toxických forem látek do kořene, konkrétně například redukovaného železa (Begg *et al.*, 1994). Při nadměrném suchu snižuje tato vrstva ztráty vody do půdy (Schreiber *et al.*, 2007) a v neposlední řadě zajišťuje všeobecnou odolnost kořenů (Hose *et al.*, 2001). Pokud dojde k odumření rhizodermis kořene a kořen druhotně netloustne, přebírá exodermis funkci vrchní obranné bariéry. Na druhou stranu při vytvoření takovýchto bariér se snižuje kapacita příjmu vody a živin do kořene (Schreiber *et al.*, 2007). Navíc, když se po zaplavení rostliny vytvoří příliš silná exodermis, dojde k přerušení dodávek kyslíku do rhizosféry a nastává v okolí kořene nepříznivé redukované prostředí, které může vést až ke smrti některých kořenů (Armstrong & Armstrong, 2001). Rostlina je proto nucena optimalizovat tyto zdánlivě protichůdné procesy.

2.3.2.1. Konstitutivní a indukovaný vznik apoplastických bariér

Jak již bylo řečeno v kapitole o endodermis, tato bariéra se vytváří u většiny rostlin a její vývoj je řízen geneticky. Naopak exodermis může být tvořena konstitutivně nebo může být indukovatelná vnějšími podmínkami. Při bližším zkoumání endodermis však bylo zjištěno, že i u této konstitutivní bariéry mohou být pozorovatelné určité změny v jejím vývoji (Colmer *et al.*, 1998). Rozsah a míra, ve které jsou apoplastické bariéry vytvořeny v radiálně transversálních a tangenciálních stěnách, závisí však nejen na vnějších podmínkách, ale velice významně i na druhu rostlin vyskytujících se v různých

typech prostředí (Enstone et al., 2003) a dokonce i mezi jednotlivými genotypy (Colmer et al., 1998). Rozdíly se pak projevují na rozvoji jednotlivých bariér v daném místě, podél samotného kořene a ve vzdálenosti jejich tvorby od vrcholu kořene. To se projevuje v různě velkých ztrátách kyslíku z kořene (ROL). U mokřadních rostlin, jako ostřice (*Carex acuta*) či sítiny (*Juncus effusus*), jsou vytvářeny velmi masivní konstitutivní bariéry, zejména na bázích adventivních kořenů. Díky tomu jsou u vrcholů AK těchto rostlin pozorovány vysoké hodnoty ROL, jež klesají směrem k bázi (Armstrong et al., 2000). Naproti tomu zejména u dvouděložných rostlin, kam lze zařadit blatouch (*Caltha palustris*), pryskyřník (*Ranunculus sceleratus*) či šťovík (*Rumex palustris*), nebo u jednoděložné kukuřice (*Zea mays*), (Enstone & Peterson, 2005) či rýže (*Oryza sativa*), (Colmer, 2003), za normálních podmínek s dostatečným přísunem kyslíku nejsou vytvářeny na bázích AK žádné významné bariéry. To lze sledovat i na ROL, které se zvyšují se vzdáleností od vrcholu kořene. Při přenesení těchto rostlin do média s nedostatečným obsahem kyslíku dochází k indukci určitých bariér, které jsou však svým rozsahem nižší, než jaké se tvoří u mokřadních rostlin (Colmer et al., 1998; Visser et al., 2000).

Příkladem, jak tyto dvě vrstvy, byť téměř shodné co do podobnosti i funkce, mohou reagovat na tentýž stimul i opačným způsobem, může být pozorování kukuřice (*Z. mays*) pěstované v různých typech kultivačních prostředí s odlišnou dostupností kyslíku. Nejvýraznější vliv byl nalezen u vodní kultivace. U rostlin v neprovzdušňované hydroponii byla pozorována překvapivá redukce tvorby suberinové lamely v endodermis. Casparyho proužky této vrstvy nebyly ovlivněny. Naproti tomu se však v exodermis silně zvýšil vývoj Casparyho proužků i suberinové lamely. Zdá se, že tím rostliny redukuje uvolňování kyslíku z aerenchymatických kanálů do rhizosféry a zvyšují difúzi kyslíku do středního válce (Enstone & Peterson, 2005). Při provzdušňování kultivačních médií dochází k výraznému snížení rychlosti tvorby Casparyho proužků a ukládání suberinové lamely v endodermis i v exodermis (Enstone & Peterson, 1998; Enstone *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2000). Tento způsob kultivace však indukuje dřívější vznik terciární stěny v endodermis, zatímco v exodermis se tato modifikace během krátkodobé kultivace neobjevuje (Enstone & Peterson, 2005). Naopak u rostlin pěstovaných v prostředí s dobrou dostupností kyslíku, jako jsou vermikulit či pěstování v nasyceném vzduchu (aeroponii), dochází k rychlému vývoji Casparyho proužků téměř u všech buněk obou vrstev a k urychlení depozice suberinové lamely, většinou dříve v endodermis než v exodermis (Enstone & Peterson, 1998; Schreiber *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2000). Urychlený

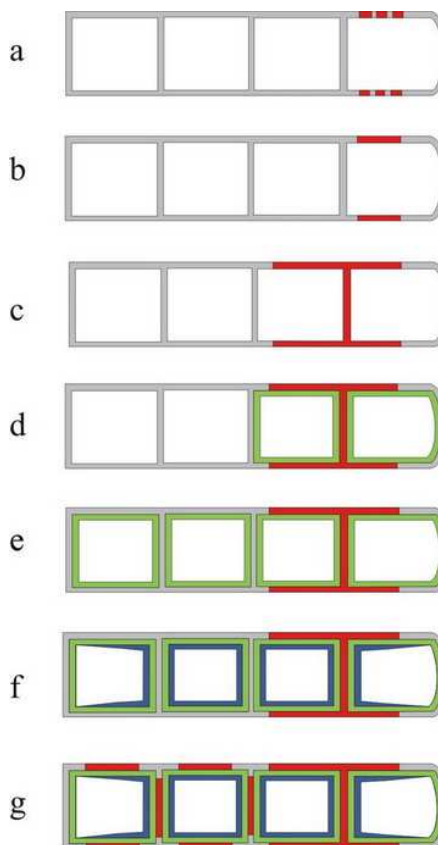
vývoj exodermis předcházející endodermis byl pozorován i při pěstování rostlin dubu (*Quercus robur*) v agaru s nedostatkem kyslíku (Soukup *et al.*, 2004). Tyto příklady jsou jasným důkazem toho, jak silný vliv má prostředí (konkrétně zejména obsah kyslíku) na celý vývoj hlavně exodermální vrstvy (Enstone *et al.*, 2003). U endodermis jde převážně o ovlivnění vývoje suberinové lamely, nikoliv Casparyho proužků (Enstone & Peterson, 2005).

Stresorů indukujících tvorbu těchto vrstev je však mnohem více než výše popsany nedostatek kyslíku. Jedním z nich je sucho, vyskytující se zejména u xerofytních rostlin (Enstone *et al.*, 2003), dalším může být salinita. Existují však (podobně jako při reakci na nedostatek kyslíku) různé strategie suberinizace apoplastických bariér při reakci na zasolení. U skočce (*Ricinus communis*) dochází k suberinizaci ECW i RHCW (Schreiber *et al.*, 2007). To působí snížení apoplastického příjmu NaCl a chrání proti vodním ztrátám. Naopak u kukuřice (*Z. mays*) dochází k ukládání suberinu pouze u ECW (Schreiber *et al.*, 2007). Podobně u této rostliny působí ztloustnutí vnitřní tangenciální stěny endodermis těžké kovy (Degenhardt & Gimmler, 2000). Naopak nedostatek živin snižuje suberinizaci, čímž je zřejmě usnadněno apoplastické vedení živin (Schreiber *et al.*, 2007). Mezi další stresové faktory ovlivňující tvorbu apoplastických bariér patří acidita, patogeny (Enstone *et al.*, 2003), teplota (Armstrong *et al.*, 1999) nebo například fytotoxiny (Armstrong & Armstrong, 2001; Armstrong *et al.*, 2000). Tvorba těchto vrstev je stimulována mechanickým odporem substrátu. Leknín (*Nymphaea odorata*) kořenící ve velmi tuhé blátivé půdě hluboko pod vodou vytváří velice silnou exodermální vrstvu (Seago *et al.*, 2000b). Ve srovnatelném substrátu rostou i kořeny orobince (*Typha angustifolia*, *T. glauca*), které vykazují podobné strukturní charakteristiky, avšak navíc modifikované ligninem uvnitř exodermální sekundární buněčné stěny deponované na sekundární lamelu, spolu s dalšími přídatnými exodermálními vrstvami. Způsob vzniku takovéto mnohvrstevné exodermis je centripetální a detailně ho popsal Seago *et al.* (1999b). Nejprve se v nejsvrchnější vrstvě mnohvrstevné hypodermis vytváří na několika místech radiálních buněčných stěn Casparyho proužky (**obr. 2.16a, červená**). Následně dochází k jejich propojení (**obr. 2.16b**) a mezi dvěma vrstvami hypodermis nejbližší povrchu vzniká struktura připomínající tvar písmene „H“ (**obr. 2.16c**). Tato struktura zasahuje do vnitřní tangenciální buněčné stěny svrchní vrstvy a do vnější tangenciální buněčné stěny druhé vrstvy a taktéž do části radiálních buněčných stěn druhé vrstvy. Takto vzniká dvojvrstevná exodermis. Poté následuje depozice suberinové lamely na vnitřní povrch buněčných stěn těchto buněk (**obr. 2.16d, zelená**), jež posléze pokračuje i

ve vnitřních buňkách hypodermis (**obr. 2.16e**). Následně probíhá lignifikace a dochází k vytvoření sekundární buněčné stěny (**obr. 2.16f, modrá**). Posledním krokem vzniku mnohvrstevné exodermis je asymetrické uložení materiálu podobného Casparyho proužkům do všech radiálních buněčných stěn s výjimkou tangenciálních buněčných stěn ležících ve svrchní a vnitřní vrstvě hypodermis (**obr. 2.16g**). Tyto přídatné struktury umožňují dobré upevnění rostlin v substrátu, mechanickou odolnost a odolnost na změny podmínek prostředí (Seago *et al.*, 1999a). Soukup *et al.* (2002) popsal podobný vzorec u rákosu (*Phragmites australis*), avšak ztloustlé buněčné stěny spíše připomínaly tvarem písmena „Y“. Odlišnosti ve tvarech obou druhů mohou být způsobeny rozdílným uspořádáním buněk hypodermis (Soukup *et al.*, 2002).

Působení stresových podmínek může indukovat tvorbu exodermálních vrstev i u těch rostlin, u kterých se za normálních podmínek nevyskytují. Příkladem může být působení mechanického stresu na bázi kořene ječmene (*Hordeum vulgare*), (Lehmann *et al.*, 2000). Výjimkou jsou luštěniny, které tuto vrstvu netvoří ani za stresu (Perumalla *et al.*, 1990b).

Obr. 2.16: Schéma vývoje vícevrstevné exodermis a H-typu Casparyho proužků; (Seago, *et al.*, 1999b), modifikováno; povrch kořene vpravo; popis v textu



2.3.2.2. Vliv podmínek prostředí na chemické složení apoplastických bariér

Chemické složení apoplastických bariér je rozdílné mezi jednotlivými druhy rostlin, avšak výrazně působí i stresové podmínky prostředí. Různé podmínky mění množství a podíl zejména alifatického a aromatického suberinu a ligninu (Hose *et al.*, 2001). Suberin, což je polyester mastných kyselin (obsahujících hydroxylové skupiny) s různou délkou řetězců, obsahuje alifatické a esterifikované aromatické složky. Za stresu převažují lineární řetězce alifatického suberinu, které jsou hlavním důvodem hydrofobních vlastností apoplastických bariér díky jejich relativně nízké propustnosti pro vodu

(Zimmermann et al., 2000). Různé stresové podmínky však mění i složení jednotlivých monomerů alifatického suberinu (Schreiber et al., 1999). Stresové podmínky, např. výše zmíněný mechanický odpor, indukují také produkci vyššího množství ligninu. Lignin je biopolymer složený z derivátů kyseliny skořicové, konkrétně z kumaryl-, koniferyl- a sinapylalkoholu. Za různých druhů stresů se však nemění celkové množství ligninu, nýbrž se mění podíl jednotlivých monomerických jednotek ligninu (Schreiber et al., 1999; Zeier et al., 1999). Nejvyšší podíl ukazuje tzv. lignin typu H. Tento typ se vyskytuje více v hypodermis než v endodermis a obecně převažuje při působení stresu. Z výsledků pokusů s hydroponickými kultivacemi, kde rostliny tvořily méně tohoto typu ligninu, lze usuzovat, že tento typ poskytuje zejména mechanickou stabilitu kořenovému systému (Degenhardt & Gimmler, 2000).

Pokud by se potvrdila myšlenka, že zesílení apoplastických bariér vede k vyšší odolnosti rostlin na stres, bude možné optimalizovat výběr rostlinných druhů podle anatomie kořene, jež pak přežijí na méně vhodných místech. Též bude možné směřovat šlechtitelské strategie či projekty vývoje obilnin k modifikacím vývoje exodermis a tudíž k lepšímu přežití na méně příznivých místech či proti atakům různých patogenů. Zatím neexistuje příliš mnoho informací o biosyntéze alifatického suberinu v kořenech. Hlavním cílem výzkumu by měla být detekce genů a enzymů zahrnutých v syntéze suberinu v kořenech užitím různých molekulárně - biologických technik (Enstone et al., 2003; Schreiber et al., 2007).

2.3.3. Souvislost vývoje apoplastických bariér s tvorbou aerenchymu a PK

I když se zprvu mnoho autorů domnívalo, že tvorba aerenchymu (alespoň lyzigenního) a vznik exodermis musí spolu nutně souviset (Justin & Armstrong, 1987; Seago et al., 1999a), ukázalo se, že tomu tak být nemusí. Mnoho pozorování dokládá, že tyto děje jsou na sobě nezávislé, alespoň ve směru podélném. U blatouchu (*Caltha palustris*), který vytváří aerenchym velmi sporadicky či vůbec, dochází přesto k vývoji exodermis. U orobince (*Typha angustifolia* i *T. glauca*) se suberinizace a lignifikace mnohovrstevné hypodermis objevuje ještě před vývojem aerenchymu (Seago et al., 1999a). Tvorba aerenchymu až v určité vzdálenosti od vzniku exodermis je zřejmě charakteristická pro mnoho mokřadních rostlin a byla pozorována u skřípiny (*Scirpus*

sylvaticus), sítiny (*Juncus effusus*), bezkolence (*Molinia coerulea*), (Lichtenberková, 2002) a u rákosu (*Phragmites australis*), (Soukup *et al.*, 2002). Naopak u vodňanky (*Hydrocharis morsus-ranae*) se vytváří aerenchym, avšak netvoří se žádná exodermis (Seago *et al.*, 1999b). Jiným příkladem může být leknín (*Nymphaea odorata*), kde exodermální vrstva dospívá až poté, co se vytvoří aerenchym (Seago *et al.*, 2000b). Podobně je tomu i u modrásky (*Pontederia cordata*), jen časová prodleva mezi dospíváním exodermis a vývojem aerenchymu je mnohem delší (Seago *et al.*, 2000a). Na načasování těchto dvou procesů mají vliv i podmínky prostředí působící na rostlinu v nich žijící (Seago *et al.*, 2000b). Například u kukuřice (*Zea mays*) pěstované ve vermikulitu s dobrou dostupností kyslíku se objevuje aerenchym téměř vždy pod plně suberinizovanými buňkami exodermis. Výjimku tvoří situace, kdy rostliny jsou zaplaveny vodou a nastává hypoxie. Tehdy se aerenchym začíná tvořit ještě před vznikem suberinové lamely v exodermis (Enstone & Peterson, 2005). Avšak v souladu se zjištěním lipidických složek v hypodermis zblochanu (*Glyceria maxima*), (viz kap. 2.3.2.) po chemické analýze si lze klást otázku, zdali u rostlin, kde byla popsána tvorba exodermis navazující na vznik aerenchymu, je tomu skutečně tak, nebo jen v oblastech blíže vrcholu nebyla exodermis zatím detekována (Soukup *et al.*, 2007).

Naopak výsledky v radiálním směru v kořenech z posledních let ukazují jasnou koordinaci mezi vývojem postranních kořenů, ukládáním suberinu v endodermis i exodermis a mezi tvorbou lyzigenního aerenchymu. Detailní pozorování kukuřice (*Z. mays*) pěstované ve vermikulitu dalo následující odpovědi. Buňkám exodermální vrstvy vždy chybí suberinová lamela, pokud se nacházejí v místech budoucího prorůstání PK. Pouze s menšími výjimkami platí, že v mladších zónách kořene bývají propustné buňky v endodermis seřazeny radiálně s buňkami v exodermis, jimž chybí suberinizované buněčné stěny. Téměř vždy se nacházejí poblíž oblastí, kde mají v budoucnu prorůst PK (Enstone & Peterson, 2005). Koordinace vývoje PK a nemodifikované exodermis byla pozorována i u rákosu (*P. australis*). Nesuberinizovaná exodermis zřejmě zajišťuje velmi malý odpor pro snadné vyrůstání PK. Oblasti, ve kterých zůstávají buněčné stěny exodermis nemodifikované, jsou nazývány „okna“, jež slouží jako místa pro radiální únik kyslíku z kořene do okolí (Armstrong *et al.*, 2000; Soukup *et al.*, 2002). Pokud se však následkem stresu, např. přítomností fyto toxinů u rákosu (*P. australis*), tato „okna“ nacházející se proti primordiím PK suberinizují/lignifikují, PK jsou uvězněny uvnitř HK a nemohou prorůst (Armstrong *et al.*, 1999). Tato „okna“ však také umožňují únik jiného plynu, ethylenu, z kořenů. To by mohlo vysvětlovat, proč sektory primární kůry

vyskytující se radiálně proti iniciálám v pericyklu netvoří lyzigenní aerenchym (Armstrong *et al.*, 2000; Enstone & Peterson, 2005). Za normálních podmínek bez přítomnosti PK utvořené apoplastické bariéry zřejmě brání úniku ethylenu, jehož zvýšená endogenní koncentrace pak může indukovat tvorbu právě tohoto typu aerenchymu. Tuto hypotézu vyslovil u orobince (*Typha angustifolia*, *T. glauca*) jako jeden z prvních Seago *et al.* (1999b). Zahrnutí ethylenu v signální dráze vedoucí k tvorbě lyzigenního aerenchymu bylo již popsáno v předchozí kapitole (2.2.2.4.), (Drew *et al.*, 2000; Gunawardena *et al.*, 2001) Jak je tomu u rostlin, kde tento aerenchym vzniká dříve než je vytvořena exodermis (viz výše) nebo kde se vytváří jiný typ aerenchymu, zůstává zatím otázkou. Jedna z prvních zmínek o odlišnostech se vyskytuje v diplomové práci Lichtenberkové (2002), kde bylo zjištěno, že u puškvorce (*Acorus calamus*), u kterého se tvoří schizogenní aerenchym, zůstává v místě vyrůstajícího PK zachován aerenchym a taktéž exodermis s Casparyho proužky a suberinovou lamelou proti vyrůstajícímu PK zůstává nepřerušena.

2.4. Auxin

Ze skupiny pěti hlavních rostlinných hormonů je auxin považován za jeden z nejdůležitějších. Název auxin pochází z řeckého slova *auxein*, což v překladu znamená růst, prodlužovat se. Největší podíl ve vyšších rostlinách má strukturně celkem jednoduchý derivát indolu IAA (kyselina indol-3-octová), který je spolu s několika dalšími, jako například 4-Cl-IAA (kyselina 4-chloroindol-3-octová), která byla nalezena u hrachu (*Pisum sativum*), a IBA (kyselina indol-3-máselná) u hořčice (*Sinapis arvensis*) a kukuřice (*Zea mays*), zahrnován do skupiny přírodních auxinů. Pro studium funkcí auxinu se užívá převážně syntetická forma 1-NAA (kyselina naftalen-1-octová) a v menší míře též 2,4-D (kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová), (Taiz & Zeiger, 2002).

2.4.1. Syntéza auxinu a její lokalizace

Dosud nebyla nalezena rostlina, která by nebyla schopná syntetizovat tento fytohormon (Callis, 2005). Auxin je v některých vyšších rostlinách syntetizován z aminokyseliny tryptofanu, avšak u všech zkoumaných rostlin existuje též paralelní cesta, která je na tryptofanu nezávislá (Zažímalová & Napier, 2003). Podle původního předpokladu byla syntéza auxinu lokalizována výhradně ve vrcholech prýtu. Sledováním

nadzemních částí rostliny byla syntéza *de novo* detekována zejména v mladých listech a v dělohách, přičemž největší kapacitu syntézy mají mladé listy, u nichž se při zvětšování jejich velikosti postupně snižuje hladina auxinů, a to až stokrát (Ljung *et al.*, 2001). Pozdější výsledky sledování transportu auxinů z nadzemních zdrojů do kořenů a sledování projevů při pokusech s odstraňováním různých částí rostliny prokázaly, že auxin může být potenciálně produkován téměř všemi částmi rostlinného těla. Podrobným měřením míry syntézy v podzemních částech byla nejintenzivnější syntéza lokalizována v meristému, nicméně i v dalších částech kořene byla *de novo* syntéza potvrzena (Ljung *et al.*, 2005).

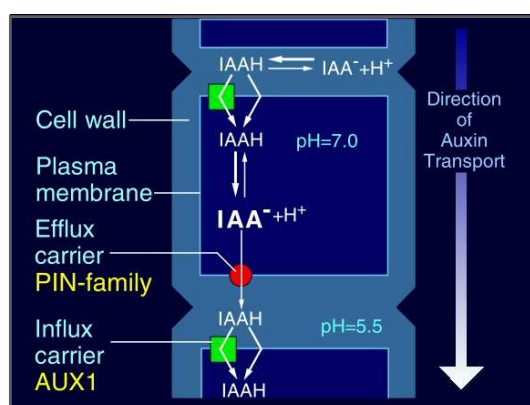
2.4.2. Transport auxinu

Transport auxinu ve vyšších rostlinách je řízený proces, podílející se na regulaci vývoje a růstu rostlin (Paciorek & Friml, 2006). Bylo zjištěno, že jsou transportovány přirozené i syntetické auxiny. Transport probíhá dvěma různými cestami, které se doplňují a navzájem na sebe navazují. První z těchto cest probíhá v rostlině nepolárně a bývá označována jako transport na dlouhou vzdálenost. Probíhá ve floému, ve kterém je auxin transportován hromadným tokem spolu s ostatními metabolity, čemuž odpovídá i rychlost toku $5 - 20 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ (Friml & Palme, 2002). Směr toku závisí na umístění metabolických sinků, proto je tento transport energeticky nenáročný (Swarup *et al.*, 2001).

Oproti ostatním růstovým regulátorům je auxin navíc distribuován skrz rostlinné tělo aktivně, jednosměrným polárním transportem (Leysner, 2001; Benjamins *et al.*, 2005). Polární auxinový transport (dále PAT) představuje typ transportu na krátkou vzdálenost, který probíhá z buňky do buňky (cell-to-cell), (Rashotte *et al.*, 2000). Je zprostředkován specifickými přenašeči, což způsobuje jeho nižší rychlost, kolem $5 - 20 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$, a vyšší energetickou náročnost (Friml & Palme, 2002). Z těchto důvodů je citlivý na nedostatek kyslíku, čehož se spolu s inhibitory PAT využívá při studiu účinků tohoto typu transportu na různé vývojové procesy. Nejznámější z inhibitorů, které blokuje výtok auxinu z buněk, jsou NPA (kyselina 1-N-naftalenftalamová), která se řadí do skupiny tzv. fytotropinů (Muday *et al.*, 2003), a kompetitivní inhibitor TIBA (kyselina 2,3,5-trijodbenzoová), (Friml & Palme, 2002; Boerjan *et al.*, 1995). V poslední době se také začaly používat inhibitory vtoku auxinů, jako například 1-NOA (kyselina 1-naftoxyoctová) nebo CHPAA (kyselina 3-chlor-4-hydroxyfenyloctová), avšak dosud se používají podstatně méně než inhibitory výtoku (Imhoff *et al.*, 2000; Parry *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2002).

V nadzemních částech rostliny probíhá PAT od vzrostného vrcholu stonku směrem k jeho bázi, tedy bazipetálně. Auxin je transportován, jak bylo zjištěno u hrachu (*Pisum sativum*) a huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), podél cévních svazků, v parenchymu obklopujícím cévní svazky, v prokambiu, eventuálně v nezralých xylémových elementech (Morris & Thomas, 1978; Morris *et al.*, 2004). V kořeni je auxin transportován buňkami středního válce směrem k jeho špičce, tedy akropetálně. Odtud postupuje vnějšími vrstvami kořene, pravděpodobně skrz epidermis a/nebo vnější vrstvy primární kůry, směrem k jeho bázi, tedy bazipetálně. Tento „obrat“ ve směru toku auxinu kořenem bývá popisován jako „fountain-model“ (Benková *et al.*, 2003). V roce 2005 přišli Blilou *et al.* s úpravou tohoto modelu, který rozšířili o existenci jakéhosi zpětného toku auxinu (auxin reflux loop) směřujícího z vnějších vrstev kořene zpět do jeho vnitřních vrstev. Tento systém zřejmě umožňuje kořenům určitou nezávislost na auxinu dopravovaném z nadzemních částí rostliny.

Obr. 2.17: Schéma chemiosmotické hypotézy (Friml, 2003)



V cytoplasmě je hodnota pH vyšší (pH~7) než v prostoru buněčné stěny (pH~5,5), proto molekuly auxinu, které jsou slabé kyseliny ($pK_a = 4,75$), po překročení plazmatické membrány snadno disociují a díky svému náboji, který jim znemožňuje samovolný průchod plazmatickou membránou, jsou „lapy“ v buňce (Leyser, 2005). Tento gradient pH je udržován aktivitou protonových pump, H^+ ATPáz, umístěných na plazmatické membráně (Taiz & Zeiger, 2002).

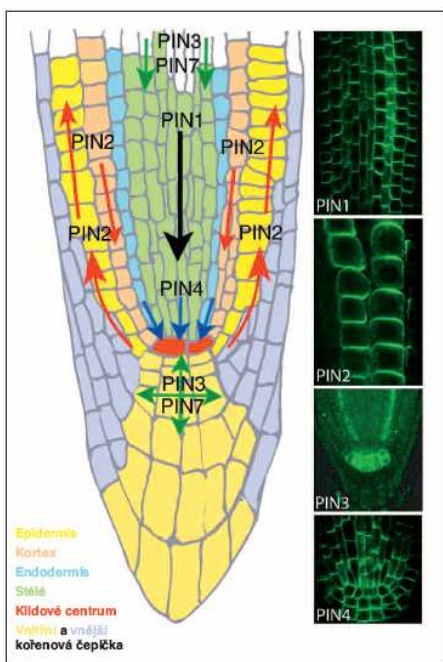
Aktivní přenos auxinu přes plazmatickou membránu do buňky zajišťují auxinové vtokové přenašeče zvané AUX1, které byly nalezeny u huseníčku (*A. thaliana*), (Swarup *et al.*, 2001). Tyto proteiny jsou v kořenech lokalizovány v pletivech středního válce, v buňkách kolumely kořenové čepičky, v části buněk středního válce apikální části kořene navazující na funkční floém a v epidermálních buňkách kořene (Swarup *et al.*, 2001; Hobbie, 2006), (obr. 2.18). Právě AUX1 zřejmě zajišťují propojení mezi fyziologicky

Pro transport auxinu na úrovni buňky je podstatných několik mechanismů. V roce 1970 byla navržena chemiosmotická hypotéza (Jacobs & Gilbert, 1983), (obr. 2.17), podle které IAA vstupuje do buněk přes plazmatickou membránu buď pasivně v nedisociované lipofilní formě (IAAH) nebo aktivním symportem v aniontové formě (IAA^-) s dvěma protony (Blakeslee *et al.*, 2005).

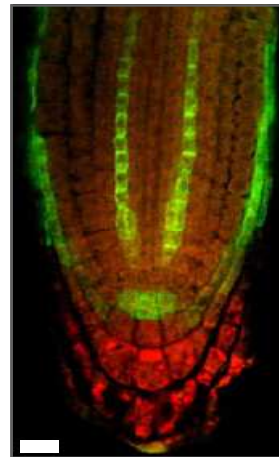
odlišnými a prostorově oddělenými cestami - PAT a floémovým transportem (Morris & Thomas, 1978; Friml & Palme, 2002).

K přenosu iontů auxinu z buňky slouží auxinové výtokové přenašeče zvané PIN proteiny (Benková *et al.*, 2003). Po dlouhou dobu nebylo jasné, zda PIN jsou vlastní transportéry, nebo jen část regulačního mechanismu řídicího jejich lokalizaci (Leyser, 2005). Teprve před dvěma lety bylo zjištěno, že PIN proteiny zprostředkovávají výtok v živočišných buňkách (HeLa) a kvasinkových buňkách bez potřeby dalších rostlinných specifických faktorů (Petrášek *et al.*, 2006). PIN je rodina osmi integrálních membránových proteinů, která kontroluje distribuci auxinu a tím i některé aspekty regulace buněčného dělení a buněčného růstu (Paponov *et al.*, 2005; Blilou *et al.*, 2005; Blakeslee *et al.*, 2005; Wisniewska *et al.*, 2006), (**obr. 2.19**). Protein PIN1 je ve stonku lokalizován v souladu s bazipetálním PAT na bazální straně prodlužujících se parenchymatických buněk xylému a buněk kambia, v kořenech byl detekován v iniciálách vodivého pletiva a

Obr. 2.19: Směry toku auxinu a lokalizace proteinu PIN v kořenové špičce; vpravo příklady detekce proteinu PIN pomocí specifických protilátek u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) (Friml, 2007)



Obr. 2.18: Imunolokalizace hematoglutinin-AUX1 ve špičce kořene, konfokální mikroskop, úsečka = 20µm (Swarup *et al.*, 2001)



jejich derivátech (Gälweiler *et al.*, 1998). Mutace tohoto genu způsobuje snížení bazipetálního transportu auxinu v ose květenství a defekt ve vývoji vodivých pletiv. Takovéto rostliny vytvářejí pouze osy květenství bez květů a podle podoby k pletací jehlici dostal tento mutant a po něm i celá genová rodina, jméno *pin* (*pin - formed*), (Gälweiler *et al.*, 1998). Ukázalo se, že tato oblast se částečně překrývá s oblastí výskytu proteinu PIN4 (Friml *et al.*, 2002b; Paponov *et al.*, 2005). Menší výskyt PIN1 byl též pozorován v epidermis a v primární kůře kořene (Blilou *et al.*, 2005). Polární lokalizace PIN1 proteinu je dána jeho neustálým cyklováním mezi plazmatickou membránou a endosomálním kompartmentem (Geldner *et al.*, 2001) a tento proces je citlivý na BFA (brefeldin A) a je pod kontrolou

proteinu GNOM (kódující ARF/GEF = ADP ribosyl factor GTP/GDP exchange factor), (Muday *et al.*, 2003). Protein PIN4 je lokalizován polárně směrem k iniciálám kolumely, tedy místu akumulace auxinu v kořenové špičce. Mutant tohoto proteinu *pin4* se vyznačuje defektem v ustavení a udržení endogenního gradientu auxinu (Friml *et al.*, 2002b). Poté je auxin veden bazipetálním transportem, který ho přemísťuje do prodlužovací zóny kořene. Tento transport je zajištěn proteiny PIN2, které jsou umístěny polárně na horních stranách buněk epidermis, v boční kořenové čepičce a převážně na bazální straně buněk primární kůry (Müller *et al.*, 1998; Paponov *et al.*, 2005). V endodermis hypokotylu, v apikálním zakřivení a v kořeni v buňkách kolumely a po stranách buněk pericyklu ležících v prodlužovací zóně byla zjištěna přítomnost proteinu PIN3 (Friml *et al.*, 2002a). Ten svou relokací umožňuje kořeni vnímat gravitační stimul a odpovídat na něj (Friml & Palme, 2002). Pátým výtokovým přenašečem vyskytujícím se nejen v kořenech je PIN7. Jeho exprese probíhá již během časného vývoje embrya a je zahrnut v kontrole vytváření embryonální osy zprostředkované auxinem (Friml *et al.*, 2003). V kořenu je lokalizován na boku a na bazální straně prokambióálních buněk v meristematické a prodlužovací zóně a též byl nalezen v buňkách kolumely, kde se překrývá s oblastí lokalizace PIN3 (Blilou *et al.*, 2005). PIN6 je exprimován v primordiu postranního kořene a je tedy spojen s jeho vznikem (Benková *et al.*, 2003). PIN5 a PIN8 nebyla dosud přiřazena žádná funkce (Paponov *et al.*, 2005).

2.4.3. Příjem auxinu

Signální dráha auxinu u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) začíná vazbou auxinu na receptor TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), (Kepinski & Leyser, 2005; Dharmasiri *et al.*, 2005). Jde o F-box protein, který je součástí komplexu SCF. Jakmile dojde k navázání auxinu na komplex SCF^{TIR1}, jsou proteiny Aux/IAA označkovány ubiquitinem a následně degradovány. Tyto proteiny interagují s ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) a slouží jako represory transkripce (Secko, 2007). Po jejich rozkladu dochází k aktivaci ARF, které se váží přímo na DNA a aktivují transkripci genů rané odpovědi na auxin („early response genes“), (Leyser, 2001; Paciorek & Friml, 2006).

2.4.4. Projevy působení auxinu

Tato relativně jednoduchá sloučenina se uplatňuje v široké škále různých procesů. Na buněčné úrovni má potenciál ovlivňovat růst a dělení buněk (Leyser, 2001).

Při výzkumu vývoje kořenového systému a zejména jeho postranních kořenů (dále PK) se auxin řadí mezi nejprozkoumanější a nejdůležitější signály. Výsledky dnes již klasických prací ukazují, že exogenní aplikace IAA k rostoucím rostlinám stimuluje u většiny druhů vývoj a emergenci PK (tj. prorůstání PK z rodičovského kořene), (Blakely *et al.*, 1982) a naopak odnětím vrcholů prýtu a kořene či aplikací inhibitorů auxinu dochází k inhibici vývoje PK, jak bylo podrobně sledováno u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) a hrachu (*Pisum sativum*), (Wightman & Thimann, 1980; Hinchee & Rost, 1986; Casimiro *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002b). Při zkoumání účinku auxinu na určitá stádia vývoje PK se ukázalo, že auxin svou akumulací v místě budoucího primordia ovlivňuje fázi těsně předcházející antiklinálnímu dělení, která je charakteristická pro prvopočátek iniciace základu budoucího kořene (Casimiro *et al.*, 2001). Při sledování vývoje primordia u huseníčku (*A. thaliana*) se zjistilo, že buňky pericyklu na xylémovém pólu postupují do G2 fáze buněčného cyklu, kdežto ostatní buňky pericyklu zůstávají v G1 fázi (Beeckman *et al.*, 2001). Zůstává zatím nejasné jak rostliny kontrolují reaktivaci buněčných cyklů během vývoje, ale s největší pravděpodobností hrají hlavní roli rostlinné hormony, zejména právě auxiny, které zřejmě stimuluje v předem určených buňkách přechod G1 → S fáze buněčného cyklu negativní regulací transkripce CDK - inhibičních proteinů KRP2 (KIP-RELATED PROTEIN 2), (Himanen *et al.*, 2002). Auxin však neovlivňuje pouze první stádia iniciace PK (tedy vznik tzv. zakladatelských buněk), ale působí i na další stádia vývoje primordia, kdy dochází v jeho průběhu k různému přesměrovávání toku auxinu prostřednictvím přemísťování PIN proteinů (Benková *et al.*, 2003). Při sledování PAT při vývoji PK huseníčku (*A. thaliana*) s využitím příslušných inhibitorů se ukázalo, že směr toku auxinu ovlivňuje rozdílné procesy - bazipetální transport reguluje iniciaci primordia a akropetální jeho následný růst (Reed *et al.*, 1998; Bhalerao *et al.*, 2002a). Auxin je také zodpovědný za organizaci apikálního meristému uvnitř primordia (Laskowski *et al.*, 1995). Pomocí PAT se ve vrcholu kořene ustavuje auxinové maximum, které je důležité pro vznik klidového centra. Po jeho vytvoření se auxinové maximum přesouvá a ovlivňuje iniciály kolumely (Kerk *et al.*, 2000). Problematika vzniku a vývoje PK a vliv auxinu na tyto procesy je podrobněji shrnuta v mé bakalářské práci (Husáková, 2006).

Důležitou úlohu hraje auxin i v tropických odpovědích, jako například ve fototropismu (asymetrickém růstu orgánu vedoucího k ohybu za světlem), (Secko, 2007) či v gravitropické reakci kořenového systému. Rostliny vnímají zemskou gravitaci pomocí sedimentace specializovaných buněčných organel obsahujících škrobová zrna, statolitů. Po změně gravitačního vektoru se tyto organely přemísťují na nižší stranu buněk, spolu s proteiny PIN3, které jsou za normálních podmínek v plazmatické membráně umístěny rovnoměrně. Díky nim je přenášeno větší množství auxinu na nižší stranu kořene, kde v prodlužovací zóně způsobuje inhibici růstu (Friml *et al.*, 2002b; Friml, 2007; Wisniewska *et al.*, 2006; Rashotte *et al.*, 2000).

Auxin také kontroluje fylotaktické uspořádávání květů a listů (kontroluje umístění jejich základů), (Jönsson *et al.*, 2006), udržuje apikální dominanci a reguluje tvorbu apikálního zakřivení (viz kap. 2.6.). Je důležitý i pro regulaci tvorby a organizace floému a xylému. Jak bylo sledováno na epikotylech hrachu (*P. sativum*) a u huseníčku (*A. thaliana*), při poranění může auxin indukovat jejich regeneraci (Sauer *et al.*, 2006).

2.5. Ethylen

Ethylen, neboli ethen, je jediným plynným členem ve skupině pěti hlavních rostlinných hormonů. Jde o nejjednodušší alken řadící se mezi nejmenší organické molekuly, lehčí než vzduch (Cram & Hammond, 1969). Ve výzkumu, ale i v praxi, se často užívá chemický prekurzor ethylenu - ethephon (kyselina 2-chloroethylfosforečná), (Hansen & Grossmann, 2000; Mergemann & Sauter, 2000).

2.5.1. Vznik ethylenu a jeho regulace

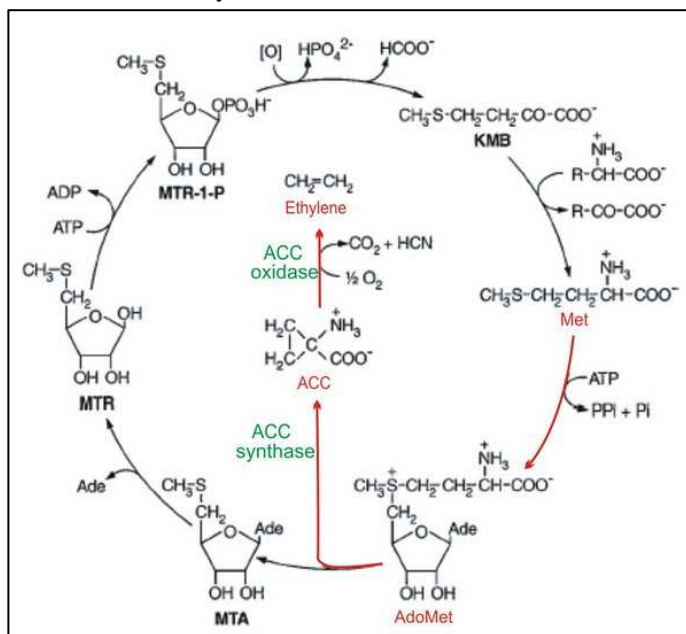
Ve druhé polovině dvacátého století byla postupně popsána biosyntetická dráha tohoto hormonu. Prvním členem této dráhy je aminokyselina methionin, která dala název celému cyklu (tzv. methioninový cyklus, zvaný též Yangův cyklus), (**obr. 2.20**), (Yu & Yang, 1979). Z methioninu vzniká ethylen dvěma mezikroky, které zahrnují vznik meziproduktu SAM (*S*-adenosyl-L-methioninu, v literatuře označovaného také jako AdoMet), (Kim *et al.*, 2001) a bezprostředního prekurzoru ethylenu, cyklické kyseliny ACC (kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové), (Bleecker & Kende, 2000). Prvním

z důležitých enzymů, řídícím přechod $\text{SAM} \rightarrow \text{ACC}$ je ACC syntáza. Patří do středně velké genové rodiny čítající u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) 12 genů (Thain *et al.*, 2004), avšak byla nalezena u řady dalších druhů rostlin (Abel *et al.*, 1995; Bleecker & Kende, 2000). Tento enzym je ovlivňován různými signály. Vnitřní hormonální signály jako auxin či cytokininy mají pozitivní vliv (Abel *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001), naopak ethylen

například u vigny (*Vigna radiata*) působí na tento enzym negativně (Kim *et al.*, 2001). K ovlivnění však dochází i působením rozličných stresů, jako například hypoxie, poranění, chladu, sucha a nebo v průběhu vývoje - při zrání plodů či stárnutí květů (Ecker, 1995; Taiz & Zeiger, 2002). Při studiu ethyleny se mezi často používané inhibitory působící na tento krok biosyntetické dráhy řadí 1-AOA (kyselina 1-aminooxo-octová) a ethoxy-analog rhizobitoxinu - AVG (aminoethoxy-vinylglycin), (Yu & Yang, 1979). Druhým důležitým enzymem je ACC oxidáza, která převádí ACC na ethylen, oxid uhličitý a kyanid (Ecker, 1995), a tento krok vyžaduje přítomnost alespoň určitého množství kyslíku (Taiz & Zeiger, 2002). ACC oxidáza patří do rodiny genů čítající u huseníčku (*A. thaliana*) 17 členů (Thain *et al.*, 2004) a u vigny (*V. radiata*) bylo zjištěno, že je pozitivně ovlivnitelná ethylenem a naopak negativně na ni působí auxin a cytokininy (Kim *et al.*, 2001). Při studiích účinku ethyleny se dříve často používaly inhibitory tohoto enzymu - CoCl_2 (Yu & Yang, 1979) či AgNO_3 (Justin & Armstrong, 1991a), avšak pro jejich nepříznivé působení na rostlinný materiál se od jejich použití často upouští ve prospěch inhibitorů enzymu ACC syntázy (Ecker, 1995). Mezi další užívané inhibitory patří například AIB (kyselina α -aminoisomáselná), což je neaktivní analog ACC (Pierik *et al.*, 1999).

U některých druhů rostlin bylo zjištěno, že produkce ethyleny je regulována prostřednictvím světlem řízených denních hodin, ovlivňujících zejména expresi genů ACC

Obr. 2.20: Methioninový cyklus (Bleecker & Kende, 2000), ACC = kys. 1-aminocyklopropan-1-karboxylová, Ade = adenin, AdoMet = S-adenosyl-L-methionin, KMB = kys. 2-keto-4-methylthiomáselná, Met = methionin, MTA = 5-methylthioadenosin, MTR = 5-methylthioribóza, MTR-1-P = 5-methylthioribóza-1-fosfát.



syntázy. Uvolňování ethylenu z huseníčku (*A. thaliana*) vykazuje jediné maximum uprostřed světelné periody (Thain *et al.*, 2004), naopak u čiroku (*Sorghum bicolor*), (Finlayson *et al.*, 2004; Finlayson *et al.*, 1998), či merlíku (*Chenopodium rubrum*), (Macháčková *et al.*, 1997) dochází u hladin ACC k denním výkyvům s několika maximy. Amplituda těchto rytmů se zvyšuje při zastínění (nízkém poměru krátkovlnného vůči dlouhovlnnému záření) a v mutantech deficientních na fytochrom B (*phyB*), (Finlayson *et al.*, 1998). Tito mutanti vykazují zvýšený poměr nadzemních ku podzemním orgánům (podobně jako normální rostliny rostoucí v zastínění), avšak je-li tento fenotyp spojen se zvýšením produkce ethylenu či spíše s absencí fytochromu B, je zatím otázkou (Finlayson *et al.*, 2004). Úloha rytmické produkce ethylenu během dne zatím nebyla určena u žádného druhu, avšak bylo zjištěno, že tyto rytmy zřejmě nejsou nepostradatelné pro rytmický růst rostlin (Thain *et al.*, 2004).

2.5.2. Receptory ethylenu a vedení signálu

Při studiu signální dráhy ethylenu u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) hráli nezastupitelnou roli mutanti identifikovaní podle tzv. triple response. Výrazných morfologických změn na ethylen u etiolovaných rostlin hrachu si poprvé všiml Neljubow již v roce 1901 (Taiz & Zeiger, 2002). U huseníčku (*A. thaliana*) se tato odpověď projevuje inhibicí prodlužování kořenů a hypokotylu, radiálním tloušťnutím hypokotylu a nadměrným zakřivením jeho vrcholu (**obr. 2.21**), (Guzmán & Ecker, 1990; Ecker, 1995; Smalle *et al.*, 1997). Díky skutečnosti, že je ethylen plyn, jenž lehce proniká vodou i hydrofóbním prostředím, může se pohybovat rostlinou téměř bez omezení, a tudíž není potřeba přísné lokalizace

Obr. 2.21: Tzv. triple response u etiolovaných rostlin huseníčku (*Arabidopsis thaliana*); (Štěpánová & Alonso, 2005)



receptorů ani žádného složitějšího transportního aparátu (Štěpánová & Alonso, 2005). Ethylen je přijímán rodinou pěti receptorů (ETR 1 = ETHYLENE RESISTANT, ETR 2 = ETHYLENE RECEPTOR, ERS 1, ERS 2 = ETHYLENE RESPONSE SENSOR a EIN 4 = ETHYLENE INSENSITIVE) se sekvenční podobností s bakteriálním dvoukomponentním systémem histidinových kináz (Visser & Voeselek, 2004). Díky rozvoji charakterizace mutantů huseníčku (*A. thaliana*) byla sestavena dráha přenosu signálu (Štěpánová &

Alonso, 2005). Podle tohoto modelu jsou receptory aktivní pouze v nepřítomnosti hormonu. Po jeho navázání se receptory stávají neaktivními a dochází k aktivaci CTR 1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1), což je negativní regulátor signální cesty a je považován za centrální část této dráhy. Přenos signálu je v současné době neznámý, uvažuje se o MAP-kinázové kaskádě (MAPK = MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE). Dalšími členy signální dráhy ethylenu jsou pozitivní regulátory EIN 2 (Guzmán & Ecker, 1990) a následně EIN 3 (nebo jemu podobný EIL), který reguluje transkripci ERF 1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR), jehož exprese vede k aktivaci určitých odpovědí na ethylen (shrnutu v Guo & Ecker, 2004; Visser & Voeselek, 2004).

2.5.3. Projevy působení ethylenu

I když je ethylen nejjednodušší organickou sloučeninou s biologickou aktivitou, zprostředkovává celou řadu různých procesů (Štěpánová & Alonso, 2005). Ačkoliv téměř každé pletivo rostlin má schopnost syntetizovat tento fytohormon, jeho normální produkce se uskutečňuje v odpovědi na jisté vývojové fáze či podněty prostředí (Guzmán & Ecker, 1990). Produkce ethylenu však není omezena pouze na rostliny, což dokládá nález u houby *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Waggoner & Dimond, 1954).

Na buněčné úrovni je ethylen schopen měnit osud buněk, které zůstávají kompetentní k buněčnému dělení, a polaritu samotného buněčného dělení. Působení ethylenu potlačuje buněčné dělení inhibicí syntézy DNA tím, že zabrání vstupu buněk do profáze buněčného cyklu, a to ve vrcholech prýtu i hlavních kořenů hrachu (*Pisum sativum*), (Apelbaum & Burg, 1972). Po přechodném zvýšení hladiny ethylenu v etiolovaných hypokotylech okurky (*Cucumis sativus*), (Pierik *et al.*, 1999) však dochází ve vyvíjející se epidermis ke značnému zvýšení počtu buněčných dělení (Kazama *et al.*, 2004). U etiolovaných rostlin hrachu (*P. sativum*) byl popsán i jeho vliv na buněčnou diferenciaci (Apelbaum *et al.*, 1972), (viz kap. 2.6.).

V závislosti na načasování ošetření ethylenem, na fyziologických podmínkách, věku a druhu rostliny ethylen pozitivně či negativně ovlivňuje prodlužování jednotlivých rostlinných orgánů. Jedním z klasických vlivů ethylenu u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) je jeho omezení růstu kořene nebo na prodlužování hypokotylu etiolovaných rostlin (Guzmán & Ecker, 1990; Štěpánová *et al.*, 2005). Naopak stimulaci růstu vykazuje u kořenového vlášení rajčete (*Lycopersicon esculentum*), (Clark *et al.*, 1999), při tvorbě

adventivních kořenů, při tvorbě aerenchymu za hypoxických podmínek (Drew *et al.*, 2000) nebo u hypokotylu huseníčku (*A. thaliana*) rostoucího na světle (Smalle *et al.*, 1997), (viz kap. 2.6.).

Během vývojových procesů byla nezastupitelná role ethylenu popsána také při určování pozice buněk, ze kterých vznikají kořenové vlásky, prostřednictvím aktivace/deaktivace proteinu CTR 1 (Tanimoto *et al.*, 1995), u tvorby adventivních kořenů petunie (*Petunia x hybrida*) a rajčete (*L. esculentum*), (Clark *et al.*, 1999), klíčení semen nebo například zrání plodů. Bylo zjištěno, že některé plody vykazují na počátku zrání zvýšenou respiraci spolu se zvýšenou produkcí ethylenu. Jsou řazeny do skupiny tzv. klimakterických plodů a řadí se k nim například jablka, banány, avokádo, rajčata, fíky, mango, olivy, broskve, hrách, švestky, hrušky, meruňky, nektarinky, borůvky nebo třeba kiwi (Taiz & Zeiger, 2002; Trainotti *et al.*, 2007), (viz kap. 2.6.). Mezi další funkce ethylenu patří přerušování dormance semen a pupenů, určení pohlaví květů (Taiz & Zeiger, 2002) nebo urychlení otevírání květů například u růže (*Rosa hybrida*), kde je ethylen nejprve vnímán semeníkem (Xue *et al.*, 2008). Důležitou úlohu má ethylen i při stárnutí pletiv nebo opadu orgánů. U transgenních rostlin tabáku (*Nicotiana glauca*) mutací genu receptoru ethylenu ETR 1-1 z huseníčku (*A. thaliana*) je zpožděn nástup a průběh stárnutí listů a květů (Yang *et al.*, 2008). Ethylen též způsobuje zeslabení apikální dominance snížením poměru auxinu/cytokininů ve vrcholech prýtu petunie (*P. hybrida*), čímž podporuje růst postranních pupenů (Haver *et al.*, 2003).

Při zkoumání vlivu prostředí bylo zaznamenáno, že se jeho hladina zvyšuje při mechanickém poškození rostliny, při zatopení, mrazu, suchu nebo při napadení patogenem (Ecker, 1995; Bleecker & Kende, 2000). Při prorůstání kořenů rajčete (*L. esculentum*) utuženou půdou hraje ethylen také významnou roli, neboť bylo zjištěno, že kořeny mutantů necitlivých na ethylen rostly v mechanicky odolnější půdě hůře než kořeny kontrolních rostlin (Clark *et al.*, 1999). Ethylen je též vyžadován pro úspěšnou kompetici rostlin o světlo. Jak bylo sledováno u tabáku (*N. tabacum*), ethylen již ve velmi nízkých koncentracích slouží rostlině jako jeden ze signálů, který ji informuje o přítomnosti sousedních rostlin. Při příjmu signálu rostlinou dochází ke stimulaci prodlužování prýtu a napřímení listů (hyponastii), což rostlině umožňuje vyhnout se negativnímu vlivu zastínění (Pierik *et al.*, 2003).

2.6. Interakce mezi auxinem a ethylenem

Samotný auxin i ethylen hrají velice důležitou roli v mnoha rozličných procesech růstu a vývoje rostlin. V mnoha případech se však jejich působení překrývají či vzájemně doplňují. I když v současné době je velmi mnoho známo o přenosu signálu auxinu i ethylenu, zatím existuje jen málo informací o jejich vzájemné interakci. U mnoha procesů, kde byl zprvu předpokládán vliv jediného fytohormonu, byla později zjištěna součinnost i více než dvou. To vysvětluje, jak jediná látka může zprostředkovat škálu různých procesů, ať již v samotném růstu a vývoji rostlin, nebo různé odpovědi na abiotické i biotické stresové faktory (Růžička *et al.*, 2007; Štěpánová *et al.*, 2005).

Na molekulární úrovni má auxin pozitivní vliv na enzym ACC syntázu (Abel *et al.*, 1995 - zkoumáno u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), Hansen & Grossmann, 2000 - u svízele (*Galium aparine*)), umožňující konverzi SAM na ACC, přímý prekurzor ethylenu. V promotorech genů kódujících ACC syntázu byla nalezena ARF vazebná místa, která jsou regulována auxinem (Štěpánová *et al.*, 2007). Prostřednictvím tohoto působení mohou být mnohé procesy připisované auxinu ve skutečnosti výsledkem vlivu ethylenu (Yu & Yang, 1979; Abel *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001). Naproti tomu nedávno byly identifikovány v kořenech huseníčku (*A. thaliana*) dva geny *WEI2/ASA1* a *WEI7/ASB1* (*WEI* = *WEAK ETHYLENE INSENSITIVE*, *ASA* = *ANTHRANILATE SYNTHASE $\alpha 1$* , *ASB* = *ANTHRANILATE SYNTHASE $\beta 1$*), které jsou pozitivně regulovány ethylenem. Tyto geny kódují podjednotky anthranilát syntázy, důležitého enzymu v biosyntéze tryptofanu (zprostředkovávající konverzi chorizmátu na anthranilát), z něhož vychází jedna z drah vedoucí k syntéze auxinu (Štěpánová *et al.*, 2005). Bylo také zjištěno, že signalizace ethylenu nebo jeho odpovědi závisejí na stavu transportu auxinu, jeho signální kaskádě a odpovědi. Na druhou stranu odpověď ethylenu je postradatelná pro normální průběh pozorovatelných odpovědí auxinu (Collett *et al.*, 2000; Štěpánová *et al.*, 2005).

Procesů, ve kterých auxin a ethylen figurují společně, ať již synergicky nebo protichůdně, je mnoho, avšak molekulární mechanismy, kterými spolu tyto hormony intereagují nejsou příliš prozkoumané (Štěpánová *et al.*, 2005). Jedním z procesů kontrolovaných oběma hormony je tvorba apikálního zakřivení (apical hook) u etiolovaných hypokotylů huseníčku (*A. thaliana*), (Ecker, 1995). Vytvoření této struktury je zajištěno rozdílným růstem buněk na opačných stranách vrcholu hypokotyly a funguje jako ochrana meristematických částí prýtu, když klíčící rostlina prorůstá půdou na povrch (Taiz & Zeiger, 2002). Bylo zjištěno, že ethylen stimuluje tvorbu a udržení zakřivení

aktivací transkripce *HLS 1 (HOOKLESS 1)*, který naopak snižuje hladiny proteinu ARF 2, jenž slouží jako negativní regulátor auxinové odpovědi v apikálním zakřivení. Dalším z prvků ovlivňujících tento proces je světlo, které snižuje hladiny proteinu HLS1, čímž se hromadí ARF 2 a dochází k narovnávaní zakřivení (Li *et al.*, 2004). Zajímavé je, že na kontrole prodlužování hypokotylu huseníčku (*A. thaliana*) ve tmě se zřejmě podílejí vedle auxinu a ethylenu též gibereliny, další z členů skupiny fytohormonů, avšak všechny tyto regulátory zřejmě pracují na sobě nezávislým způsobem (Collett *et al.*, 2000).

Provázanost auxinu s ethylenem je zřejmá i při tvorbě kořenů. Skutečnost, že auxin v nižších koncentracích stimuluje tvorbu kořenů a ve vyšších má naopak inhibiční vliv, podobně jako ošetření kořenů ethylenem či jeho prekurzorem ACC, je již dlouho známá (Štěpánová *et al.*, 2005). Při podrobnějším zkoumání však bylo zjištěno, že zvýšená hladina auxinu způsobuje urychlení produkce ethylenu, který pak negativně ovlivňuje růst kořenů. Tedy negativní působení auxinu je ve skutečnosti způsobeno ethylenem (Růžička *et al.*, 2007). Složitost této interakce dokládá zkoumání kořenů huseníčku (*A. thaliana*) kde bylo zjištěno, že i samotný ethylen (v mutantu *aux 1*) je schopen způsobit určité snížení jejich růstu a že ethylen má zřejmě schopnost regulovat biosyntézu auxinu ve vrcholu kořenů a tím zvýšit jeho negativní účinek na jejich růst (Swarup *et al.*, 2007).

Podobnou interakci mezi těmito hormony lze pozorovat i u prýtu rostlin, kdy po zvýšení hladiny auxinu a tím i zvýšení hladiny ethylenu dochází ke zpomalení prodlužování internodií, redukci listové plochy a výskytu epinastie. Zřejmě však nejde o působení pouze těchto hormonů, neboť po zvýšení hladiny ethylenu se též zvyšuje hladina kyseliny abscisové, dalšího z členů rodiny fytohormonů (Hansen & Grossmann, 2000). Urychlení produkce ethylenu působením malého množství auxinu také podporuje tvorbu aerenchymu v primární kůře adventivních kořenů kukuřice (*Zea mays*), (Justin & Armstrong, 1991b) a zpomaluje diferenciaci metaxylému a lignifikaci vláken u etiolovaných rostlin hrachu (*Pisum sativum*), (Apelbaum *et al.*, 1972).

Jednou z morfologických adaptací na zaplavení, například u mokřadní rostliny šťovíku (*Rumex palustris*), je vytváření adventivních kořenů na nezatopených částech rostlin (Visser *et al.*, 1996). V současné době díky studiu transgenních rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) necitlivých na ethylen panuje představa, že ethylen, jehož produkce je za těchto podmínek výrazně zvýšena, zprostředkovává tvorbu AK změnou citlivosti pletiv k endogennímu auxinu, který umožňuje jejich tvorbu (McDonald & Visser, 2003; Visser *et al.*, 1996).

Zajímavá interakce mezi auxinem a ethylenem byla popsána u kořenových vlásků. Při určení buněk, ze kterých budou vyrůstat kořenové vlásky hraje významnou úlohu ethylen (Tanimoto *et al.*, 1995). Pro tvorbu kořenových vlásků je důležitý pouze auxin, avšak při jejich dalším růstu je nutná souhra obou látek (Rahman *et al.*, 2002).

Důležitá interakce těchto dvou hormonů se také projevuje při kontrole mitotické aktivity klidového centra, velikosti kořenové čepičky a diferenciace buněk čepičky u kukuřice (*Z. mays*), (Ponce *et al.*, 2005). Polární transport auxinu reguluje genovou expresi v kořenové čepičce a reguluje aktivitu klidového centra, s čímž souvisí produkce hraničních buněk. Ethylen je však schopný modulovat polární transport auxinu tím, že zřejmě snižuje koncentraci či aktivitu výtokových přenašečových proteinů, což bylo zjištěno v epikotylech hrachu (*Pisum sativum*), (Suttle, 1988). Díky této schopnosti může ethylen ovlivňovat vývoj klidového centra, velikost kořenové čepičky a pozici auxinového sinku v kořenech (Ponce *et al.*, 2005).

Dalším typickým příkladem působení ethylenu je zrání klimakterických plodů. Původní představy byly takové, že ethylen je zde jediným aktérem. Po určení několika mutantů rajčete (*Lycopersicon esculentum*) neschopných produkovat ethylen při zrání (*nr = never ripe*) se však ukázalo, že spolu s produkcí ethylenu se u rajčete (*L. esculentum*) či broskve (*Prunus persica*) zvyšuje množství auxinu. Zřejmě však, vedle již zmíněného vlivu na syntézu ethylenu, hraje auxin během zrání ještě svoji vlastní, na ethylen nezávislou roli (Trainotti *et al.*, 2007).

Mezi další procesy, ve kterých se uplatňují oba tyto fytohormony, se řadí například opad různých rostlinných orgánů, regulace kvetení, kontrola morfogeneze při snížené světelné intenzitě nebo gravitropismus kořene (Taiz & Zeiger, 2002; Vandenbussche *et al.*, 2003).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Rostlinný materiál

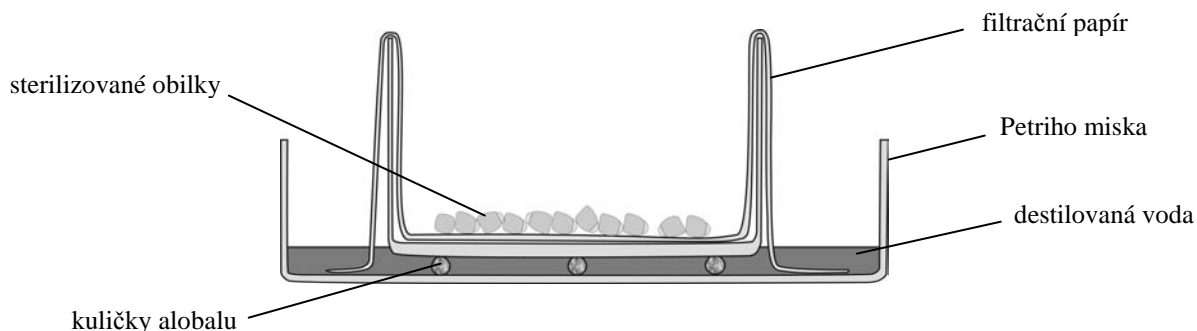
Jako experimentální materiál byla použita kukuřice setá, *Zea mays*, kultivar Cefran, Oseva Bzenec.

3.2. Kultivace rostlin

3.2.1. Sterilizace a klíčení

Obilky byly nejprve vloženy na deset minut do horké vody (cca 70° C) a následně pak ošetřeny dezinfekčním prostředkem (20% SAVO) po dobu dvaceti minut (podle Stehlíkové, (2005) - modifikováno). Po sterilizaci byly obilky vyskládány do Petriho misek na filtrační papír navlhčený destilovanou vodou. Z důvodu velké citlivosti tohoto rostlinného materiálu na zatopení, byly Petriho misky s obilkami vloženy do dalších Petriho misek větších průměrů, které sloužily jako rezervoár destilované vody. Z nich pak docházelo k difúzi vody přes filtrační papír k obilkám (**obr. 3.1**). Takto byly vloženy do termostatu na dva dny při teplotě 27° C. Poté byly vybrány reprezentativní obilky, tj. nabobtnané obilky podobné velikosti a řádkovány na Petriho misky již bez filtračního papíru, aby se zabránilo pozdějšímu prorůstání kořenů do papíru a tím i jejich poškození při další manipulaci. Obilky byly smočeny vodou asi do poloviny svého objemu a přiklopeny obrácenými Petriho miskami, aby se zabránilo osychání vyrůstajících kořenů. Takto byly opět vloženy do termostatu na jeden den. Po naklíčení byly opět vybrány reprezentativní naklíčené obilky s podobnou velikostí kořenového systému (v průměru dosahoval hlavní kořen délky 5cm) i nadzemní části (cca 4cm).

Obr. 3.1: Klíčení obilek kukuřice (*Z. mays*)

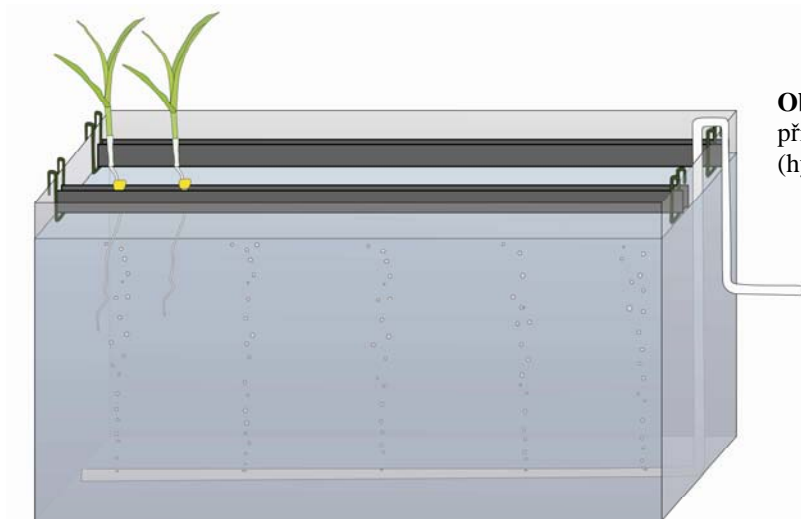


3.2.2. Typy kultivací a kultivační podmínky

Rostliny byly kultivovány dvěma způsoby - pomocí vodních kultur a kultivací v papíru.

3.2.2.1. Vodní kultury

Naklíčené obilky byly přeneseny do kultivačních nádob. Jako kultivační nádoby sloužila vydezinfikovaná (prostředkem SAVO) skleněná pětilitrová neprůtoková akvária se stěnami zvenku polepenými černou fólií. Ta zabraňovala vstupu světla ze stran ke kořenům a tím i množení nežádoucích fototrofních organismů. Vstupu světla shora bylo zabráněno alobalem vloženým na hladinu živného roztoku. Naklíčené rostliny byly vloženy po osmi mezi dvě skleněné lišty s molitanovou výstelkou připevněnou silikonem. V každé nádobě bylo možno umístit dvě takovéto dvojice lišt a tudíž 16 rostlin (**obr. 3.2**).



Obr. 3.2: Schéma uspořádání pokusu při kultivaci rostlin ve vodních kulturách (hydroponii)

Rostliny byly kultivovány ve čtvrtinovém živném roztoku Hoagland 3 s mikroelementy (**tab. 3.1**), do kterého byly následně aplikovány sledované látky v různých koncentracích (viz kap. 4. - Výsledky). Vypařující se roztok byl denně doléván destilovanou vodou.

Tab. 3.1: Čtvrtinový živný roztok Hoagland 3 s mikroelementy, upraveno (Hoagland & Amon, 1950)

MAKROELEMENTY	ŽIVNÝ ROZTOK		MIKROELEMENTY	ŽIVNÝ ROZTOK	
	koncentrace			koncentrace	
	c [mg/l]	c [mmol/l]		c [mg/l]	c [μmol/l]
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	295,0	1,25	Fe citrát	2,5	$0,01 \cdot 10^3$
KNO_3	126,5	1,25	H_3BO_3	7,11	0,1150
KH_2PO_4	34,0	0,25	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	70,28	0,3550
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	61,5	0,25	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,35	0,0047
			$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,35	0,0003
			$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,22	0,0009

Podle diplomové práce Stehlíkové (2005) byla zvolena doba kultivace šest dní. Hodnota pH, na počátku kultivace nastavená na 5,5, byla každý den kontrolována pomocí pH metru Multi Line P4. Zejména ke konci kultivace, kdy se hodnota pH zvyšovala až o 1,5 jednotky, bylo pH udržováno mezi hodnotami 5,3-5,6 přidávkou 1M HCl a 1M NaOH. Kultivace probíhala v kultivační místnosti. Délka světelné periody byla 16 hodin s osvětlením $435 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ a teplotou 25° C . Relativní vzdušná vlhkost byla udržována mezi 50 - 60%. Během temné periody trvající 8 hodin klesla teplota na 18° C . Všechny varianty byly probublávány akvarijním motorkem. Pro rovnoměrné provzdušňování byla na dno připevněna horkou jehlou propíchaná hadička táhnoucí se po celé délce akvária. Neboť veškeré vodní kultury byly prováděny shodným způsobem, byl obsah kyslíku v roztoku zjišťován pomocí elektrody Universal Meter MultiLine P4 pouze u jedné kultivace a pohyboval se po celou dobu měření kolem 80% maximálního nasycení. Detailní výsledky měření obsahu kyslíku během kultivace v porovnání s výsledky z neprovzdušňované kultivace jsou uvedeny v příloze (kap. 8.). U variant pěstovaných za stálé tmy byla akvária přiklopena černými plastovými boxy.

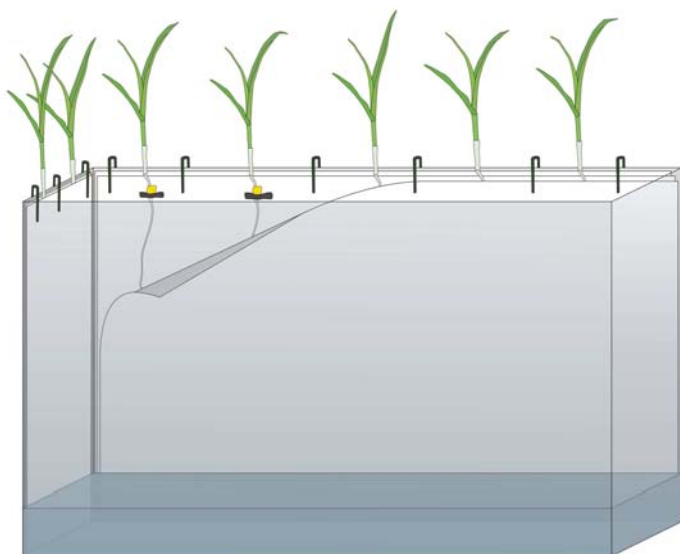
Po šesti dnech kultivace byly rostliny odebrány z akvárií, opláchnuty vodou a dále zpracovány.

3.2.2.2. Kultivace v papíru

Vysterilizované obilky byly vysypány na filtrační papír a ponechány pár minut k oschnutí. Jako kultivační nádoby sloužila skleněná akvária s rozměry 22,5 x 7,5 x 21cm, k jejichž stěnám byly připevněny tři vrstvy filtračního papíru. Ten byl vydezinfikován v klasické kuchyňské mikrovlnné troubě působením mikrovln po dobu 12 minut s výkonem 350W. O dalším využití mmikrovln při dezinfekcích pojednává například práce

(Park *et al.*, 2006). Ošchlé obilky byly lepeny nařezanou voděodolnou páskou na střední vrstvu filtračního papíru v kultivačních nádobách. Z obou stran obilky byl přidán nastříhaný vázací drát, čímž se vytvořil jakýsi tunel pro rostoucí kořenový systém (Lenochová, submitted). V každé nádobě bylo připevněno 18 - 23 obilek (**obr. 3.3**).

Na dno nádoby bylo nalito 0,5l živného roztoku Hoagland 3 s mikroelementy (**tab. 3.1**), do kterého byly následně aplikovány sledované látky v různých koncentracích (kap. 4 - Výsledky). Vypařující se roztok byl doplňován destilovanou vodou. Na počátku kultivace bylo pH nastaveno na hodnotu 5,5. Dále nebylo sledováno.



Obr. 3.3: Schéma uspořádání pokusu při kultivaci rostlin v papíru

Doba kultivace činila sedm dní. Neboť kukuřice (*Z. mays*) je rostlinou klíčící za tmy, byla akvária během prvních 2,5 dní přiklopena černým plastovým boxem pro zabránění přístupu světla k obilkám. U variant pěstovaných za stálé tmy byly tyto boxy ponechány během celé doby kultivace. U variant, které byly pěstované za normálních světelných podmínek, byla akvária s obilkami po odklopení vložena do černých boxů pro zabránění pronikání světla přes papír ke kořenům a shora byly přiloženy pruhy alobalu.

Nádoby s obilkami byly vloženy do kultivační místnosti (kultivační podmínky viz kap. 3.2.2.1.). Pro technické potíže s kultivační místností se u označených kultivací (viz kap. 4 - Výsledky) muselo využít kultivačních boxů. I když byl kladen veliký důraz na zachování stejných parametrů teploty (25° C při 16-ti hodinové fotoperiodě, 18° C ve tmě), relativní vlhkosti vzduchu (60%) a osvětlení (435 W.m⁻²), z technických důvodů nebylo možné dosáhnout stejných hodnot osvětlení. Jak se ukázalo z měření luxmetrem, osvětlení v klimaboxu bylo ve srovnání s kultivační místností asi 2,5 krát nižší (konkrétně 174 W.m⁻²). To se zásadně projevilo na výsledcích, které byly odlišné od výsledků

získaných z rostlin pěstovaných v kultivační místnosti. Proto v kapitole 4 uvádím hodnoty získané z obou kultivačních míst.

Po uplynuté době kultivace byly rostliny očištěny od filtračního papíru, opláchnuty vodou a dále zpracovány.

3.3. Experimentální varianty

Jednotlivé experimenty obsahovaly vždy rostliny kontrolní, pěstované jednak za normálních světelných podmínek a jednak pěstovaných za stálé tmy. Za stejných světelných podmínek byly též pěstované rostliny, jejichž kultivační roztok obsahoval různé koncentrace syntetického auxinu (1-NAA, kys.naftalen-1-octová; Calbiochem) a/nebo inhibitoru ethylenu (1-AOA, hemihydrochlorid kys. aminoxy-octové; MP Biomedicals). Z kultivací z obou kultivačních míst byl získán soubor 20 - 25 rostlin. Veškeré kultivace byly jednou zopakovány.

U všech rostlin byl spočten počet listů a změřena jejich celková délka od mezokotylu po špičku nejdelšího listu. Dále byla stanovena její čerstvá hmotnost a suchá hmotnost po usušení při 70° C. Z kořenového systému byly odebrány hlavní kořeny, u nichž byla změřena jejich celková délka. Další měření se lišila podle typu kultivace (kap. 3.3.1., 3.3.2.). U variant, kde mezokotyl dosahoval délky více než 2mm, byla zaznamenána jeho délka, čerstvá hmotnost a suchá hmotnost. U odebraných obilek byla měřena taktéž čerstvá hmotnost a suchá hmotnost.

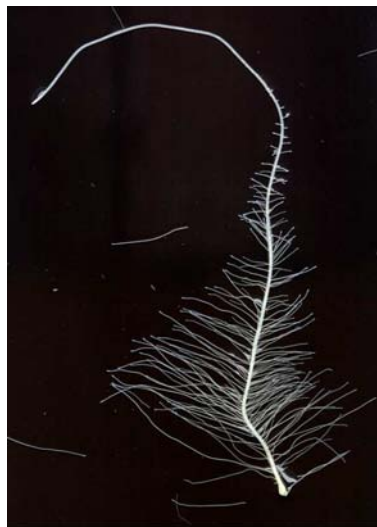
Pro dokumentaci celkového vzhledu rostlin byl použit fotoaparát Canon 300D.

3.3.1. Zpracování hlavních kořenů, vodní kultivace

U rostlin z hydroponických kultivací byla část hlavních kořenů nejprve zvážena a následně skenována na vodní hladině pomocí upraveného skeneru HP ScanJet 4C (**obr. 3.4**). Tyto kořeny byly dále zpracovány metodou analýzy obrazu s použitím softwaru LUCIA G (Laboratory Imaging, Praha), ve kterém byla pro tyto účely vytvořena Martinem Sáblem příslušná makra. Ze zjištěných dat byly vybrány - délka hlavní osy kořene, celková délka postranních kořenů, počet postranních kořenů a celková délka kořenového systému (v tomto případě hlavního kořene s postranními kořeny). Program Lucia G umožňuje získání i dalších dat, jako např. objemu a povrchu HK, avšak z důvodu práce

s prahováním, které nemohlo být díky složitosti struktury vždy nastavené na stejnou hodnotu, tato data nebyla vyhodnocována. Stejně tak program umožňuje počítání PK prvního i vyšších řádů, avšak kořeny kukuřice (*Z. mays*) již po deseti dnech kultivace tvořily vysoký počet postranních kořenů, jež díky vzájemnému překryvu nemohly být programem správně rozděleny do řádů. Z tohoto důvodu, i když byly pouhým okem pozorovány po deseti dnech kultivace již i PK druhého řádu, ve výsledcích jsou uvedeny pouze jako PK bez rozlišení jednotlivých řádů. Tento program umožňuje detekovat pouze postranní kořeny o minimální délce 1mm. K určení celkového počtu postranních kořenů a k určení počtu založených primordií je nutné použít jiné postupy.

Obr. 3.4: Naskenovaný kořen pro následnou analýzu v kořenovém analyzátoru v programu Lucia G.



Další část hlavních kořenů získaná z kultivace v hydroponii byla vložena do fixační směsi 50% FAA (název z: formaldehyde, acetic acid, alcohol) (**tab. 3.2**) a dále použita na trvalé preparáty (odebrané části viz kap. 3.4.2.).

Složení 50% FAA	[v/v]	pro 0,5l 50% FAA
ethanol	50%	250ml
kys.octová	5%	25ml
formalín	5%	25ml
destilovaná voda	40%	200ml

Tab. 3.2: Složení 50% FAA (Němec, 1962)

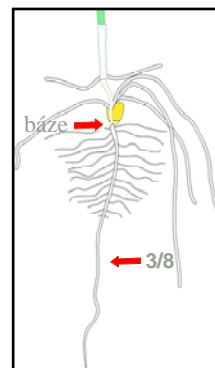
3.3.2. Zpracování hlavních kořenů, kultivace v papíru

Hlavní kořeny rostlin vypěstovaných v papíru byly dále rozděleny na tři soubory. U první části kořenů byla zjištěna čerstvá hmotnost a těž suchá hmotnost. Další část kořenů byla naložena pro fixaci do 70% ethanolu a použita pro ruční řezy. Třetí díl byl vložen do 50% FAA (**tab. 3.2**) a použit na trvalé preparáty. Odebrané části se shodují s částmi odebranými u kořenů kultivovaných v hydroponii.

3.4. Sledované jevy

3.4.1. Sledované jevy na ručních řezech

Ruční řezy byly použity jednak k histochemické detekci modifikace buněčných stěn, jednak pro další analýzy. Řezy nařezané klasickou žiletkou dosahovaly tloušťky minimálně 150 μ m. Z jedné oblasti bylo pořízeno vždy maximálně 15 řezů. Ke zjištění rozsahu suberinizace a lignifikace buněčných stěn byly hlavní kořeny nařezány v oblasti



Obr. 3.5: Oblasti na hlavním kořeni použité pro histochemickou detekci modifikace buněčných stěn

báze a ve 3/8 jeho délky (**obr. 3.5**). Oblast ve 3/8 hlavního kořene byla vybrána jako nejzasší místo, kde lze vést ruční řez u všech kultivovaných variant. Blíže špičce u rostlin pěstovaných zejména za stálé tmy byly kořeny příliš tenké pro tento druh řezů. Ruční řezy byly barveny Wiesnerovým činidlem. Jde o směs 1% floroglucinolu s 12% HCl, která se používá pro důkaz ligninu, díky jeho schopnosti barvit skořicové, ale i mnohé další alifatické a aromatické aldehydy. Lze však použít i pro pozorování ukládání suberinu díky jeho aromatickým fenylypropanovým jednotkám strukturně podobným ligninu. K obarvení řezů došlo již po dvou minutách. Poté byly, pro možné riziko poničení částí mikroskopu působením zejména par z HCl, přeneseny do okyseleného glycerolu (glycerol:H₂SO₄, v poměru 5:1), pozorovány mikroskopem Olympus BX50 a snímány kamerou Nikon Digital Sight DS-U1. Obarvené aldehydy mají červenou až tmavěčervenou barvu (Němec, 1962).

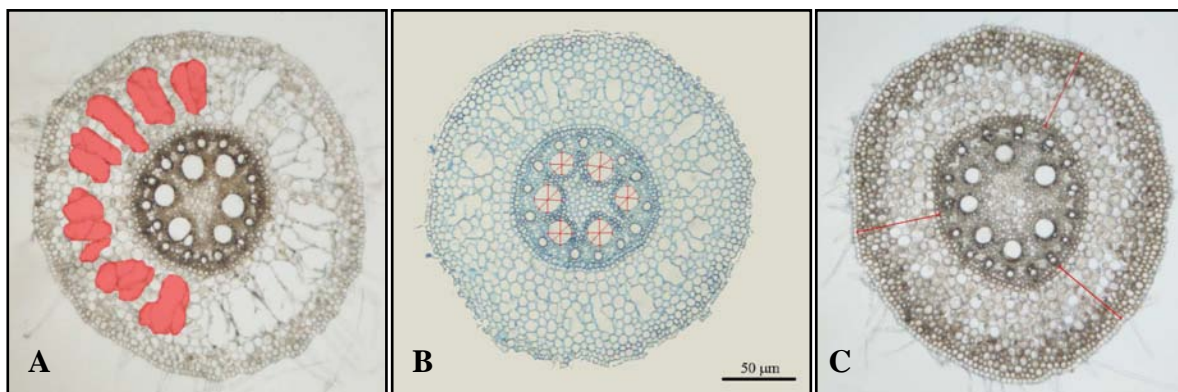
Řezy pro zjišťování zastoupení aerenchymu v primární kůře hlavního kořene byly získány z oblasti poloviny, z tří čtvrtin a z báze hlavního kořene. Nebarvené řezy byly vloženy do PBS (**p**hosphate **b**uffered **s**aline), (**tab. 3.3**), vyfotografovány a použity v programu Lucia.G (Laboratory Imaging, Praha) v makru pro analýzu plochy aerenchymu vytvořeném Martinem Sáblem (**obr. 3.6**). Pro tuto analýzu bylo použito z každé varianty pět kořenů a z každého kořene tři řezy.

PBS	[g/l]
NaCl	8,000
KCl	0,200
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,310
KH ₂ PO ₄	0,158

Tab. 3.3: Složení PBS, takto namíchaný pufr má pH = 7,3.

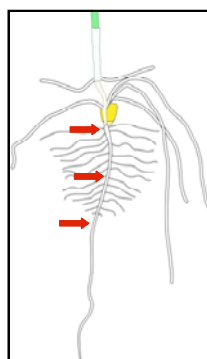
Dále na řezech z oblasti báze byla v programu Lucia G zjišťována tloušťka primární kůry, počet vrstev celé primární kůry a počet jejích jednotlivých vrstev (exodermis, mezodermis, endodermis), (**obr. 3.6**). Na každou variantu bylo počítáno pět kořenů a z každého kořene tři řezy. Tloušťka primární kůry a počet jednotlivých vrstev primární kůry byly zjišťovány pomocí tří úseček na každém řezu.

Obr. 3.6: Analýza plochy aerenchymu - A., analýza průměru cév pozdního metaxylému - B., analýza tloušťky primární kůry - C; úsečka platí pro všechny tři fotografie



3.4.2. Sledované jevy na trvalých preparátech

Vzorky byly odebrány z následujících částí hlavního kořene - oblast poloviny kořene, kde se vyskytují postranní kořeny převážně ve stádiu primordií, dále z oblasti tří čtvrtin kořene, kde jsou postranní kořeny již plně vyvinuté a z báze hlavního kořene (**obr. 3.7**).



Obr. 3.7: Oblasti na hlavním kořeni použité pro tvorbu trvalých preparátů

Fixované vzorky v 50% FAA (**tab. 3.2**) byly nejprve několikrát proprány v 50% etanolu, infiltrovány pomocí butanolové řady a převedeny do zalévacího média - parafínu, popř. histoplastu¹ (**tab. 3.4**).

Tab. 3.4: Dehydratace, infiltrace a zalití do parafínu (popř.histoplastu); zkratky: dop.=dopoledne, odp.=odpoledne, EtOH = etanol, ButOH = butanol (Němec, 1962).

den	čas	postup	poznámky
1.den	dop.	2-3x vymýt v 50% EtOH	Pokud objekty ve fixázi plavou, je nutné je před převáděním vložit do vývěvy a odsát z pletiv nežádoucí vzduchové bubliny.
	odp.	45% H ₂ O: 30% EtOH: 25% ButOH obarveno toluidínovou modří	Počáteční krok butanolové řady se volí dle obsahu alkoholu ve fixázi. Součet obsahu alkoholů v butanolové řadě musí být shodný s obsahem alkoholu ve fixázi (zde použito 50% FAA). Toluidínová modř se užívá u bezbarvých objektů pro zlepšení jejich viditelnosti a tím usnadnění práce s nimi.
2.den	dop.	30% H ₂ O: 30% EtOH: 40% ButOH	
	odp.	20% H ₂ O: 25% EtOH: 55% ButOH	
3.den	dop.	10% H ₂ O: 20% EtOH: 70% ButOH	
	odp.	0% H ₂ O: 15% EtOH: 85% ButOH	Tyto čtyři kroky lze provést v kratších časových intervalech.
4.den	dop.	0% H ₂ O: 0% EtOH: 100% ButOH	Po pár hodinách ještě jednou přelít do čistého ButOH. Kořeny nesmí být v čistém ButOH bez parafínu přechovávány příliš dlouho.
	odp.	parafín "0", T=40°C, víčka	Z lahviček je nutné slít ButOH asi 4/5 objemu. Víčka zabrání vypařování ButOH.
5.den	odp.	T=63°C	
8.den	dop.	odebrat víčka	Nechat vypařit ButOH. V tuto dobu dát rozehrát parafín "1".
	odp.	slít parafín "0", doplnit parafínem "1"	Parafín v lahvičkách se slévá vždy cca do 4/5 objemu. V tuto dobu dát rozehrát parafín "2".
9.den	odp.	slít parafín "1", doplnit parafínem "2"	V tuto dobu dát rozehrát parafín "3".
10.den	odp.	slít parafín "2", doplnit parafínem "3"	V tuto dobu dát rozehrát parafín "4".
11.den	odp.	slít parafín "3", doplnit parafínem "4"	Číslo parafínu označuje jeho čistotu (obsah ButOH) - čím vyšší číslo, tím čistší zalévací médium.
12.den	odp.	zalévání do bločků	

Vzorky byly řezány na rotačním mikrotomu Leica RM 2155. Řezy 8µm silné byly lepeny na sklíčka pomocí směsu glycerolu s bílkem a barveny safraninem a anilínovou modří (**tab. 3.5**). Jako uzavírací médium byl použit pertex. Trvalé preparáty z rostlin vypěstovaných v hydroponii byly u označených kultivací použity pro analýzu plochy aerenchymu (použito 5 kořenů, z každého kořene 4 řezy) a měření počtu a průměru cév pozdního metaxylému (kde bylo použito pět kořenů a díky malé variabilitě výsledků 2 řezy a 3 měření na každou cévu).

¹ Při převádění do histoplastu jsou kroky zcela totožné díky jejich velice podobné teplotě tání ($t_{\text{parafín}} = 56 - 58^\circ \text{C}$; $t_{\text{histoplast}} = 56 - 57^\circ \text{C}$), avšak z důvodu rychlého nasycení butanolem je nutné časté větrání trouby.

Tab. 3.5: Barvení safraninem a anilínovou modří, upraveno pro materiál používaný v této práci (Němec, 1962)

postup	aplikovaná látka	doba	poznámky
Odfarbení	toluen I	3min	
	toluen II	3min	
	toluen III	3min	
Zavodnění	100% EtOH	3min	
	96% EtOH	2min	
	70% EtOH	2min	
Barvení	safranin	1,5h	
	70% EtOH	2s	Pozor, v alkoholu se safranin velice snadno vymývá.
	70% EtOH	2min	
	96% EtOH	2min	
	saturovaný roztok kys.pikrové v 96% EtOH	2s	Kys.pikrová slouží ke stabilizaci barvy. Lze vynechat.
	96% EtOH+2kapky NH ₄ O	2s	
	100% EtOH	2s	
	anilínová modř	55s	Schopnost buněk barvit se anilínovou modří klesá s rostoucím stupněm diferenciací kořenového pletiva.
	100% EtOH	5s	Oplach anilínové modři
100% EtOH	2s		
100% EtOH	2s		
	toluen I	3min	
	toluen II	2min	
	toluen III	2min	
Zavírání			

3.5. Statistické zpracování výsledků

Ke statistickému hodnocení dat byl použit program NCSS 1997. U morfometrických dat (tj. čerstvá hmotnost, hmotnost sušiny a délka jednotlivých částí orgánů rostliny) bylo testování nulových hypotéz provedeno testem One way ANOVA. Pokud v některých případech nebylo splněno normální rozdělení, byl použit k testování nulových hypotéz Kruskal-Wallisův neparametrický test.

Hlavním postupem použitým k testování přítomnosti průkazných rozdílů u dat získaných z obrazové analýzy byl test Repeated Measures ANOVA (metoda opakovaných měření). Tento algoritmus počítá se vzájemnými vztahy v rámci jednoho kořene (měření řezů v rámci jednoho kořene jsou na sobě závislé) a jako náhodný prvek uvažuje jednotlivé kořeny dané varianty. Tento model však bohužel pracuje tak, že průměruje hodnoty v rámci jednoho kořene, čímž dochází k matematickému zúžení datového souboru, a proto se snižuje citlivost testu. Ačkoliv je tento test pro dané uspořádání experimentu

směrodatný, neukázal v řadě případů významné odlišnosti, a to zvláště tam, kde byly naměřené rozdíly malé. Pro vyřešení tohoto problému by bylo nutné rozšířit uspořádání experimentu. Tento test byl použit pro analýzu dat zjištěných při měření tloušťky primární kůry, počtu vrstev primární kůry, při analýze plochy aerenchymu, počtu a průměru cév pozdního metaxylému. Ve třech posledně zmíněných souborech byl test Repeated Measures ANOVA použit k porovnávání výsledků na dvou úrovních - jednak k porovnání získaných dat v dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami a dále k porovnání získaných dat u jednotlivých oblastí dané varianty. Vzhledem k nízké citlivosti testu je možné se domnívat, že takto zjištěné rozdíly jsou skutečně statisticky významné, a proto byly výstupy tohoto testu podkladem pro prezentované grafy.

Pro jemnější analýzu dat byl použit model GLM ANOVA, který jednotlivé hodnoty v rámci varianty neprůměruje. Díky tomu algoritmus počítá rovnocenně se všemi naměřenými hodnotami. Stává se tak v tomto případě citlivější a rozlišuje i menší rozdíly mezi srovnávanými variantami. Na druhou stranu však test zanedbává vztahy mezi jednotlivými měřeními v rámci kořene a nepočítá s jednotlivými kořeny jako zdrojem náhodné variability. Proto je třeba rozdíly prokázané pomocí GLM ANOVA chápat jako méně významné.

Všechny použité varianty analýzy rozptylu (ANOVA) byly doplněny Tukey-Kramerovým testem vícenásobného srovnání. Tím bylo zjištěno, které soubory se od sebe navzájem odlišují.

Velikost souboru dat získaných z obrazové analýzy se lišila v závislosti na daném typu analýzy. U biometrických analýz jsou počty dat uvedeny vždy v tabulkách s ostatními výslednými hodnotami. Většinou 45 dat bylo použito pro každou variantu k testování výsledků z měření plochy aerenchymu v primární kůře HK, z měření tloušťky primární kůry a ze zjišťování počtu jejích vrstev. Kolem 500 dat pro každou variantu bylo použito pro testování výsledků pocházejících z měření průměru a počtu cév pozdního metaxylému.

Veškeré testy byly nastaveny na hladinu významnosti $\alpha = 0,05$. Při grafickém znázornění dat byla chybovými úsečkami znázorněna střední chyba průměru.

4. VÝSLEDKY

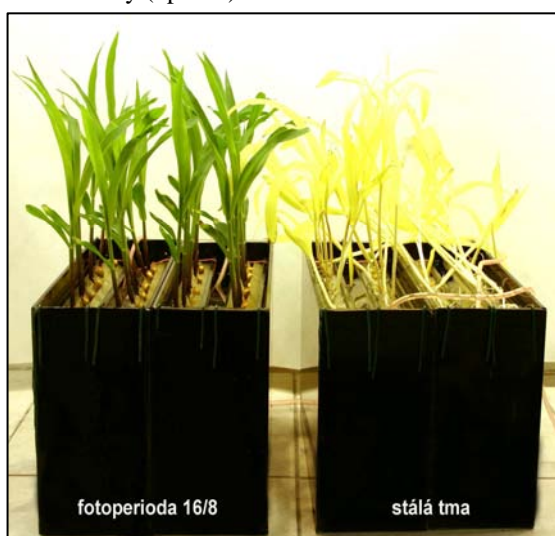
4.1. Růstové charakteristiky

4.1.1. Vliv 1-NAA

4.1.1.1. Hydroponická kultivace

Kultivace kontrolních rostlin pěstovaných za normálních světelných podmínek v hydroponii byly označeny „SK“, za stálé tmy „TK“ (obr. 4.1). Rostliny, jež rostly v roztoku s danou koncentrací auxinu (tab. 4.1), byly označeny při pěstování za normálních podmínek „SA“, za stálé tmy „TA“. Pro zjednodušení jsem pak použila pro jednotlivé koncentrace značení uvádějící počet řádů, kterými se daná koncentrace odlišuje od poslední testované koncentrace (tj. $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$). Kultivace s koncentrací $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ byla jednou zopakována.

Obr. 4.1: Celkový pohled na rostliny pěstované za normálních světelných podmínek (vlevo) a za stálé tmy (vpravo) ve vodní kultuře.

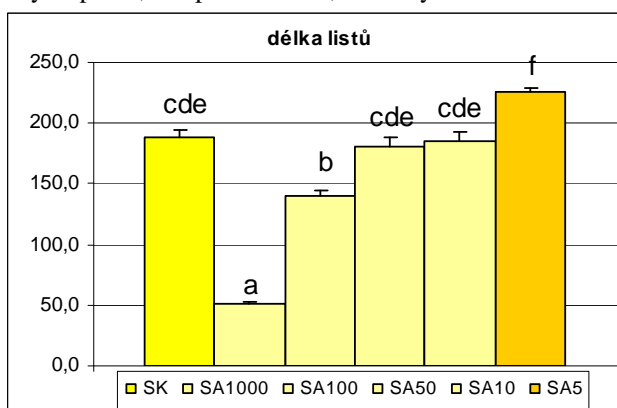
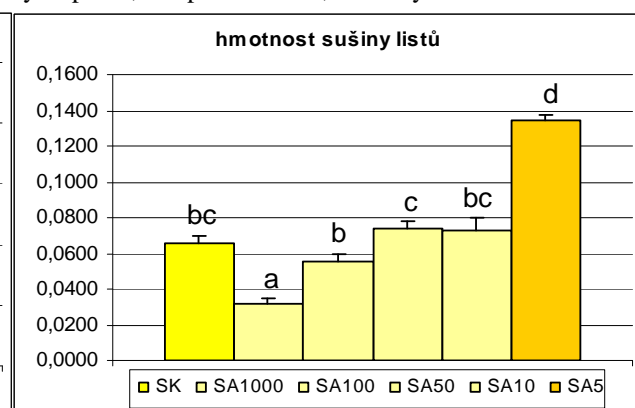


Tab. 4.1: Koncentrace auxinu a jejich označení

1-NAA	c [M]				
koncentrace	10^{-8}	10^{-9}	$5 \cdot 10^{-10}$	10^{-10}	$5 \cdot 10^{-11}$
označení	1000	100	50	10	5

4.1.1.1.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8

Po deseti dnech kultivace s různými koncentracemi 1-NAA za normálních světelných podmínek v hydroponii byly zjištěny u rostlin morfologické změny (tab. 4.2). U nadzemních orgánů byly tyto změny výrazné zejména u délky a hmotnosti sušiny listů. Vyšší dávky auxinu způsobily významnou redukci délky listů. Se snižující se koncentrací však klesal i negativní vliv auxinu a nejnižší použitá koncentrace již byla pro růst listů naopak stimulující (graf 4.1).

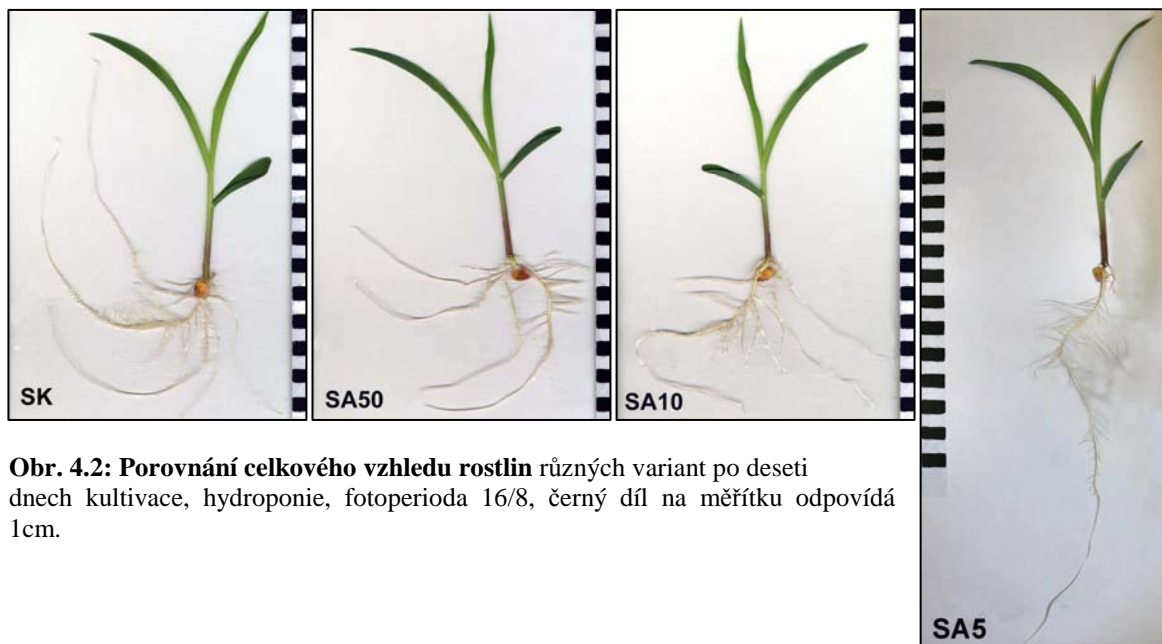
Graf 4.1: Délka listů desetidenních rostlin [mm], hydroponie, fotoperioda 16/8, uvedeny SE**Graf 4.2: Hmotnost sušiny listů** desetidenních rostlin [g], hydroponie, fotoperioda 16/8, uvedeny SE

V kultivacích SA1000, SA100 a SA50 byly na čepelích listů pozorovatelné různé rozsáhlé léze, lokální chlorózy a oschlé okraje. Rostliny z kultivace SA5 měly vytvořené čtyři nestejně dlouhé listy, kdežto ostatní varianty (včetně SK) tvořily o jeden list méně (**obr. 4.2**). U čerstvé a suché hmotnosti listů byl pozorovatelný podobný trend jako u délky listů, stimulační vliv konečné koncentrace auxinu byl taktéž dobře rozeznatelný a statisticky průkazný, a to zejména u hmotnosti sušiny listů (**graf 4.2**). Vzhledem k velice negativním účinkům auxinu v kultivaci SA1000 na růst nadzemních částí rostlin pěstovaných za normálního osvětlení nebyla tato kultivace dále sledována.

Tab. 4.2: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po deseti dnech kultivace za normálních světelných podmínek, vodní kultury (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SK		SA1000		SA100		
délka listů [mm]	188,33 ± 5,3337	cde	50,889 ± 1,9337	a	140,35 ± 4,7751	b	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	1,0858 ± 0,0643	b	0,2083 ± 0,0137	ab	0,7235 ± 0,0549	a	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0660 ± 0,0040	bc	0,0322 ± 0,0026	a	0,0555 ± 0,0035	b	p<0,01
délka mezokotylu [mm]	6,5364 ± 0,7744	b			1,8500 ± 0,1071	a	p<0,01
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,0489 ± 0,0043	b			0,0635 ± 0,0040	c	p<0,01
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0034 ± 0,0002	b			0,0039 ± 0,0002	a	p<0,05
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,2948 ± 0,0308	a			0,4308 ± 0,0146	b	p<0,01
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1256 ± 0,0055	ab			0,1438 ± 0,0076	b	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	33		9		20		

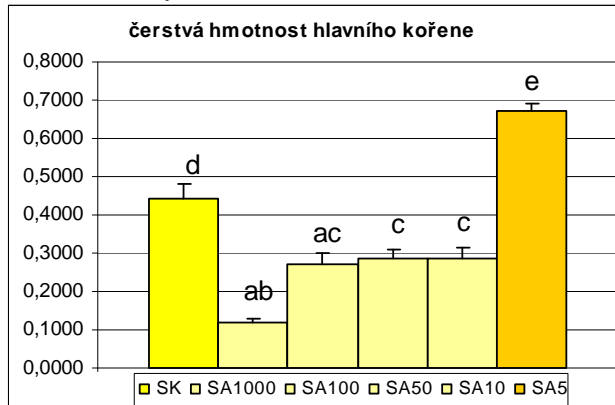
Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SA50		SA10		SA5		
délka listů [mm]	181,33 ± 7,1989	cde	184,92 ± 8,3703	cde	226,08 ± 2,9502	f	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,9542 ± 0,0594	ab	0,9348 ± 0,0775	ab	1,6677 ± 0,1259	ab	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0743 ± 0,0041	c	0,0733 ± 0,0065	bc	0,1344 ± 0,0026	d	p<0,01
délka mezokotylu [mm]	10,667 ± 0,4615	c	9,0000 ± 0,3118	b	7,4615 ± 0,3708	b	p<0,01
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,0441 ± 0,0030	a	0,0380 ± 0,0025	a	0,0294 ± 0,0015	a	p<0,01
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0032 ± 0,0002	a	0,0027 ± 0,0003	a	0,0028 ± 0,0001	a	p<0,05
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4386 ± 0,0193	b	0,4536 ± 0,0181	b	0,3670 ± 0,0133	ab	p<0,01
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1342 ± 0,0082	b	0,1577 ± 0,0130	c	0,0955 ± 0,0049	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	12		12		13		



Obr. 4.2: Porovnání celkového vzhledu rostlin různých variant po deseti dnech kultivace, hydroponie, fotoperioda 16/8, černý díl na měřítku odpovídá 1cm.

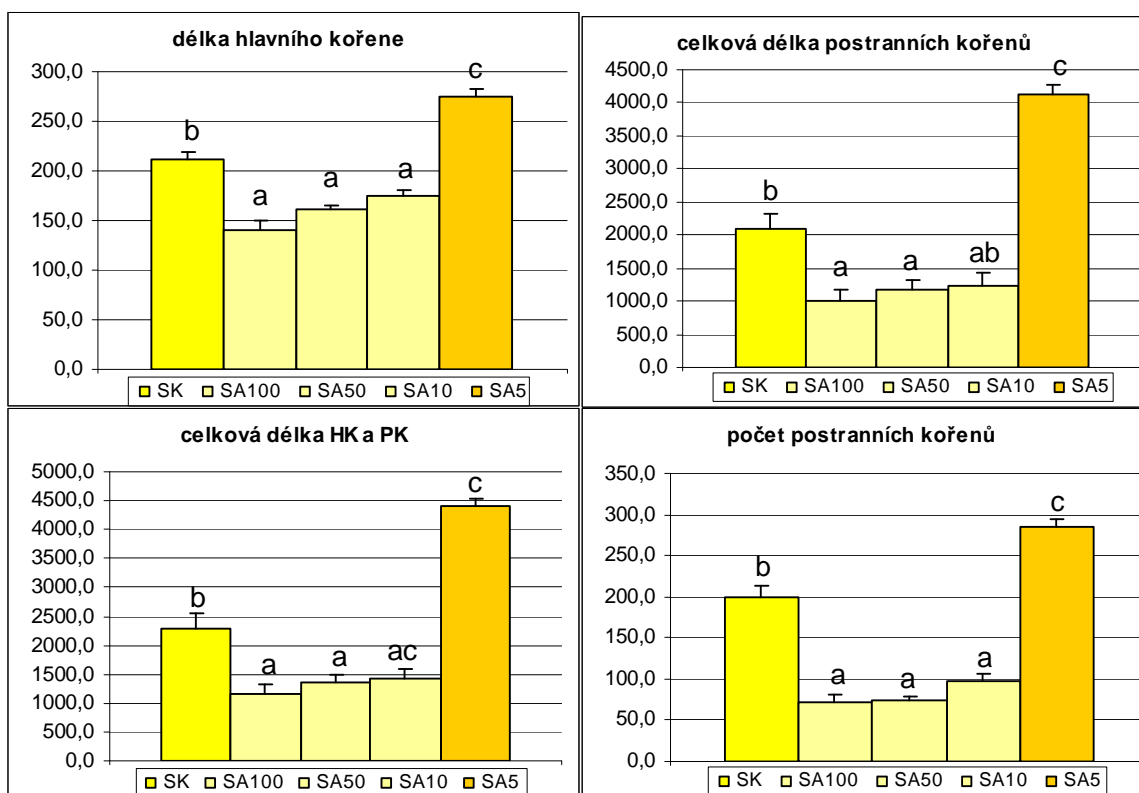
U hlavních kořenů způsobily vyšší koncentrace auxinu, opět jako u listů, výrazný úbytek čerstvé hmotnosti a pouze konečná koncentrace vykazovala oproti kontrole výrazný stimulační, statisticky průkazný vliv (**graf 4.3**). Rostliny ve všech kultivacích vytvářely vedle hlavních kořenů též adventivní kořeny, které nebyly podrobně sledovány, nicméně s klesající koncentrací auxinu se snižovala i jejich délka a rostl poměr mezi HK a AK. V kultivaci SA5 dosahovaly adventivní kořeny délky maximálně třetiny hlavního kořene (**obr. 4.2**).

Graf 4.3: Čerstvá hmotnost hlavního kořene rostlin z desetidenní kultivace [g], hydroponie, fotoperioda 16/8, uvedeny SE



Po deseti dnech kultivace v hydroponii za normálních světelných podmínek vytvořily rostliny hlavní kořeny dlouhé kolem 210mm. Po aplikaci auxinu v koncentracích $1 \cdot 10^{-9}M$, $5 \cdot 10^{-10}M$ či $1 \cdot 10^{-10}M$ dochází ke snížení této délky. Ke stimulaci prodlužování HK došlo až v kultivaci SA5, kdy kořeny dosahovaly délek mnohem vyšších než tomu bylo u rostlin kontrolních. Tataž tendence se objevila i u celkové délky postranních kořenů, celkové délky hlavních kořenů s jejich postranními kořeny a i u počtu postranních kořenů (**tab. 4.3, grafy 4.4**).

Grafy 4.4: Charakteristiky kořenového systému rostlin (délka hlavních a/nebo postranních kořenů [mm], počet postranních kořenů [počet]) z desetidenní kultivace, hydroponie, fotoperioda 16/8, uvedeny SE



Tab. 4.3: Charakteristiky kořenového systému rostlin (délka hlavních a/nebo postranních kořenů, počet postranních kořenů a čerstvá hmotnost hlavního kořene) po deseti dnech kultivace, hydroponie, fotoperioda 16/8, (uvedeny průměrné hodnoty a SE); *data, jež nebyla získána metodou analýzy obrazu

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SK		SA1000		SA100		
délka hlavního kořene [mm]	212,03 ± 7,4805	b			141,16 ± 8,3452	a	p<0,01
celková délka postranních kořenů [mm]	2082,1 ± 251,66	b			1004,2 ± 178,93	a	p<0,01
celková délka hl.a postr.kořenů [mm]	2292,0 ± 257,35	b			1145,4 ± 184,14	a	p<0,01
počet PK [počet]	199,88 ± 14,357	b			71,733 ± 9,1596	a	p<0,01
čerstvá hmotnost hlavního koř.[g] *	0,4412 ± 0,0410	d	0,1202 ± 0,0097	ab	0,2731 ± 0,0281	ac	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	22		10		15		
Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SA50		SA10		SA5		
délka hlavního kořene [mm]	162,12 ± 3,8851	a	174,09 ± 7,1164	a	275,12 ± 7,4974	c	p<0,01
celková délka postranních kořenů [mm]	1184,6 ± 136,88	a	1237,2 ± 187,17	ab	4139,7 ± 130,89	c	p<0,01
celková délka hl.a postr.kořenů [mm]	1346,8 ± 139,73	a	1411,3 ± 191,38	ac	4414,8 ± 130,69	b	p<0,01
počet PK [počet]	73,636 ± 5,3848	a	96,700 ± 9,1608	a	285,11 ± 9,6577	c	p<0,01
čerstvá hmotnost hlavního koř.[g] *	0,2860 ± 0,0236	c	0,2876 ± 0,0279	c	0,6704 ± 0,0204	e	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	11		10		12		

4.1.1.1.2. Rostliny pěstované za stálé tmy

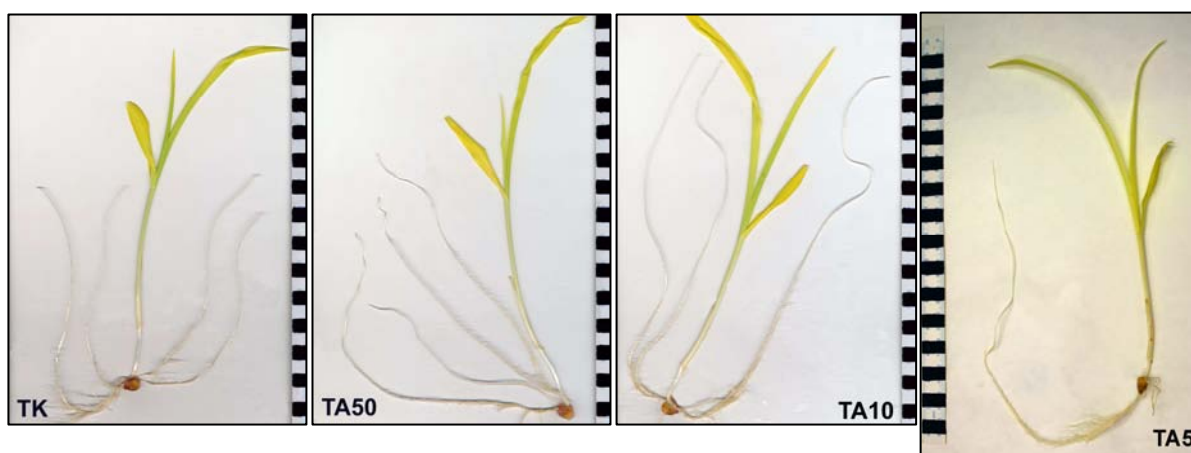
Po deseti dnech kultivace s různými koncentracemi 1-NAA za podmínek stálé tmy v hydroponii byly zjištěny méně výrazné rozdíly v biometrických charakteristikách než u rostlin pěstovaných při normálním osvětlení (**tab. 4.4**). Koncentrace $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$ nebyla za těchto světelných podmínek zkoušena. Po aplikaci všech zkoušených koncentrací auxinu nebyly oproti příslušné kontrole zjištěny statisticky významné rozdíly. V počtu listů také nebyl zjištěn rozdíl mezi variantami. Rostliny vytvářely většinou tři nestejně dlouhé listy. Nižší koncentrace auxinu zvyšovaly prodlužování třetího (nejmladšího) listu (**obr. 4.3**). Proti rostlinám pěstovaným za normální fotoperiody byly tyto rostliny obecně vyšší, čerstvá hmotnost prýtů byla vyšší, naopak hmotnost sušiny nižší.

Tab. 4.4: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po deseti dnech kultivace za stálé tmy, vodní kultury (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	TK		TA100		TA50		
délka listů [mm]	222,77 ± 10,947	ab	195,83 ± 9,2384	a	237,50 ± 7,0303	ab	p<0,05
čerstvá hmotnost listů [g]	1,0057 ± 0,0924	ab	0,7723 ± 0,0797	a	1,0588 ± 0,0624	ab	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0560 ± 0,0052	ab	0,0441 ± 0,0045	a	0,0604 ± 0,0036	ab	p<0,05
délka mezokotylu [mm]	21,983 ± 2,3692	a	35,778 ± 1,9666	b	44,800 ± 3,1362	c	p<0,01
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,1153 ± 0,0052	ab	0,1313 ± 0,0050	bc	0,1533 ± 0,0110	c	p<0,01
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0054 ± 0,0003	ab	0,0065 ± 0,0003	b	0,0066 ± 0,0006	b	p<0,01
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4285 ± 0,0117	a	0,4864 ± 0,0186	b	0,3971 ± 0,0216	a	p<0,01
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1122 ± 0,0071	b	0,1452 ± 0,0095	c	0,0913 ± 0,0089	ab	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	35		18		10		

Sledované parametry	Koncentrace				Statistické zhodnocení
	TA10		TA5		
délka listů [mm]	235,38 ± 13,802	ab	255,00 ± 10,045	b	p<0,05
čerstvá hmotnost listů [g]	1,1312 ± 0,1051	ab	1,3825 ± 0,0771	b	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0622 ± 0,0060	ab	0,0736 ± 0,0041	b	p<0,05
délka mezokotylu [mm]	31,125 ± 2,6951	ac	23,769 ± 1,2879	a	p<0,01
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,1236 ± 0,0103	abc	0,0941 ± 0,0034	a	p<0,01
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0052 ± 0,0006	ab	0,0042 ± 0,0002	a	p<0,01
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4323 ± 0,0093	ab	0,3957 ± 0,0060	a	p<0,01
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1023 ± 0,0068	abc	0,0779 ± 0,0050	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	8		13		

Obr. 4.3: Porovnání celkového vzhledu rostlin různých variant v závěru desetidenní kultivace za stálé tmy, hydroponie, černý díl na měřítku odpovídá 1cm.



Při sledování hmotností hlavních kořenů byl zjištěn úbytek jejich čerstvé hmotnosti, jenž však byl patrný pouze u vyšších koncentrací. Tento úbytek oproti kontrole v kultivacích TA100 a TA50 se však neukázal být statisticky průkazný. Oproti tomu koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ měla stimulační vliv, a tudíž nejtěžší kořeny pocházely právě z této kultivace (tab. 4.5, graf 4.5). Zajímavá byla zvláštní ztlustlina střední části některých kořenů z kultivace TA100, jež se objevovala zejména u takových kořenů, které vytvářely menší množství postranních kořenů.

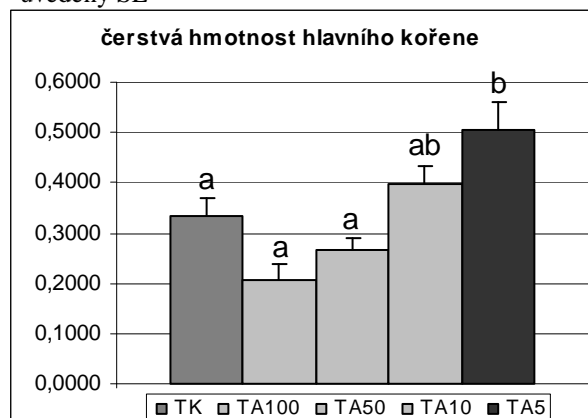
Tab. 4.5: Charakteristiky kořenového systému rostlin (délka hlavních a/nebo postranních kořenů, počet postranních kořenů a čerstvá hmotnost hlavního kořene) po deseti dnech kultivace, hydroponie, stálá tma, (uvedeny průměrné hodnoty a SE) *data, jež nebyla získána metodou analýzy obrazu

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	TK		TA100		TA50		
délka hlavního kořene [mm]	210,21 ± 16,548	b	122,96 ± 14,460	a	232,25 ± 8,6625	b	p<0,01
celková délka postranních kořenů [mm]	1670,8 ± 239,20	b	552,90 ± 156,59	a	1259,6 ± 192,69	ab	p<0,01
celková délka hl.a postr.kořenů [mm]	1881,0 ± 253,91	b	668,70 ± 168,00	a	1491,8 ± 198,89	ab	p<0,01
počet PK [počet]	174,81 ± 26,938	b	53,667 ± 13,215	a	219,22 ± 16,900	bc	p<0,01
čerstvá hmotnost hlavního koř.[g] *	0,3331 ± 0,0350	a	0,2085 ± 0,0316	a	0,2675 ± 0,0217	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	27		13		9		

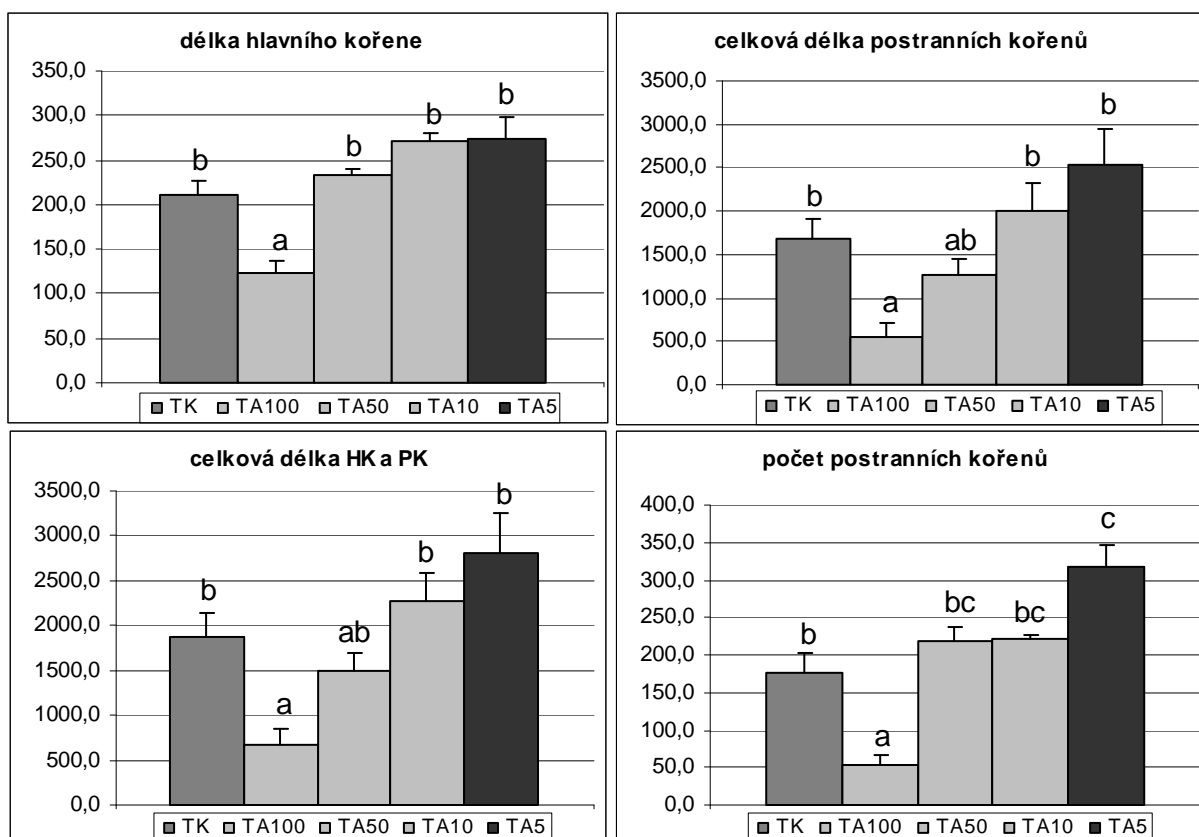
Sledované parametry	Koncentrace				Statistické zhodnocení
	TA10		TA5		
délka hlavního kořene [mm]	270,85 ± 10,204	b	273,88 ± 25,126	b	p<0,01
celková délka postranních kořenů [mm]	1997,0 ± 317,91	b	2543,5 ± 413,93	b	p<0,01
celková délka hl.a postr.kořenů [mm]	2267,8 ± 326,94	b	2817,3 ± 435,22	b	p<0,01
počet PK [počet]	221,00 ± 5,9535	bc	316,63 ± 30,828	c	p<0,01
čerstvá hmotnost hlavního koř.[g] *	0,3967 ± 0,0371	ab	0,5066 ± 0,0552	b	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	7		8		

Délka HK a délka a počet PK rostlin pěstovaných za stálé tmy byly aplikací různých koncentrací auxinu ovlivněny méně než tomu bylo u rostlin pěstovaných za normálního osvětlení (tab. 4.5, graf 4.6). Největší rozdíly byly vysledovány mezi kontrolou a kultivací TA100. Nižší koncentrace auxinu nejevily od kontroly statisticky průkazné rozdíly, a to ani kultivace TA5. Průkazné odlišnosti se projevíly mezi kontrolou a TA5 pouze u počtu PK.

Graf. 4.5: Čerstvá hmotnost hlavního kořene rostlin z desetidenní kultivace [g], hydroponie, stálá tma, uvedeny SE



Grafy 4.6: Charakteristiky kořenového systému rostlin (délka hlavních a/nebo postranních kořenů [mm], počet postranních kořenů [počet]) z desetidenní kultivace, hydroponie, stálá tma, uvedeny SE



Dílčí shrnutí vlivu 1-NAA při kultivaci v hydroponii:

- Byl testován vliv různých koncentrací auxinu na růst kukuřice pěstované v hydroponických kultivacích
- Se snižující se koncentrací auxinu klesá i jeho inhibiční vliv na délku i hmotnosti většiny nadzemních i podzemních orgánů rostlin, patrné u koncentrací $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$, $1 \cdot 10^{-9} \text{M}$, $5 \cdot 10^{-10} \text{M}$ a $1 \cdot 10^{-10} \text{M}$. Tento trend je více zřejmý u rostlin pěstovaných za normálních světelných podmínek než u rostlin pěstovaných za stálé tmy.
- Koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ má pozitivní (statisticky průkazný zejména při fotoperiodě 16/8) vliv na délku a hmotnosti listů, délku a hmotnosti hlavních kořenů i na délku a počet postranních kořenů.

4.1.1.2. Papírová kultivace

Kontrolní rostliny pěstované papírovou kultivací za normálních světelných podmínek jsem označila „SKp“, za stálé tmy „TKp“. Rostliny, jež rostly v roztoku s danou koncentrací auxinu (tab. 4.6) byly označeny při pěstování za normálních světelných podmínek „SAp“, za stálé tmy „TAp“. Kultivace s koncentrací $5 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ byla jednou zopakována. Výsledky získané z klimaboxu jsou odlišeny apostrofem od dat pocházejících z kultivační místnosti. Celkový pohled na rostliny pěstované v papírové kultivaci ukazuje - obr. 4.4.

Obr. 4.4: Celkový pohled na rostliny pěstované za normálních světelných podmínek a za stálé tmy, papírová kultivace.



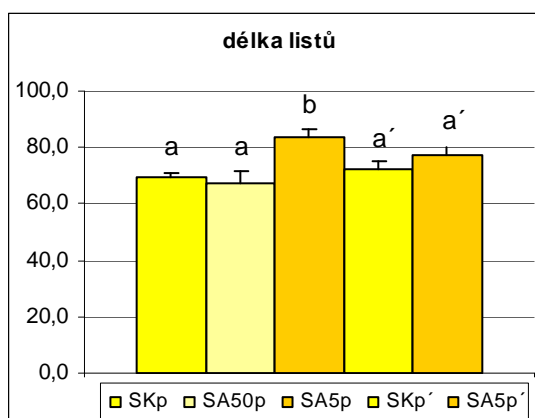
Tab. 4.6: Koncentrace auxinu užitá v kultivaci v papíru

1-NAA	c [M]	
koncentrace	$5 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-11}$
označení	50p	5p

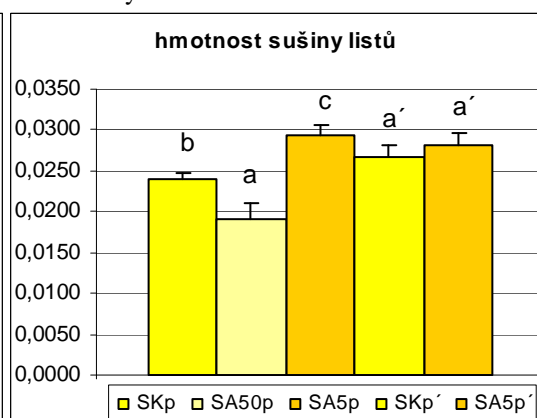
4.1.1.2.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8

Po sedmidenní kultivaci v papíru v kultivační místnosti za normálních světelných podmínek měly rostliny při růstu v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ delší listy a vyšší suchou hmotnost listů než kontrolní rostliny (obr. 4.5). Výsledky z rostlin pěstovaných v klimaboxu vykazovaly stejnou tendenci jako výsledky získané z kultivační místnosti,

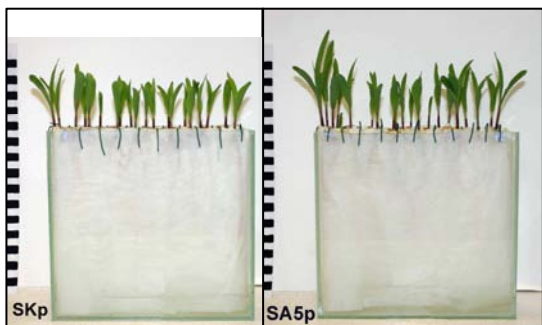
Graf 4.7: Délka listů sedmidenních rostlin [mm], papírová kultivace, fotoperioda 16/8, uvedeny SE



Graf 4.8: Hmotnost sušiny listů sedmidenních rostlin [g], papírová kultivace, fotoperioda 16/8, uvedeny SE



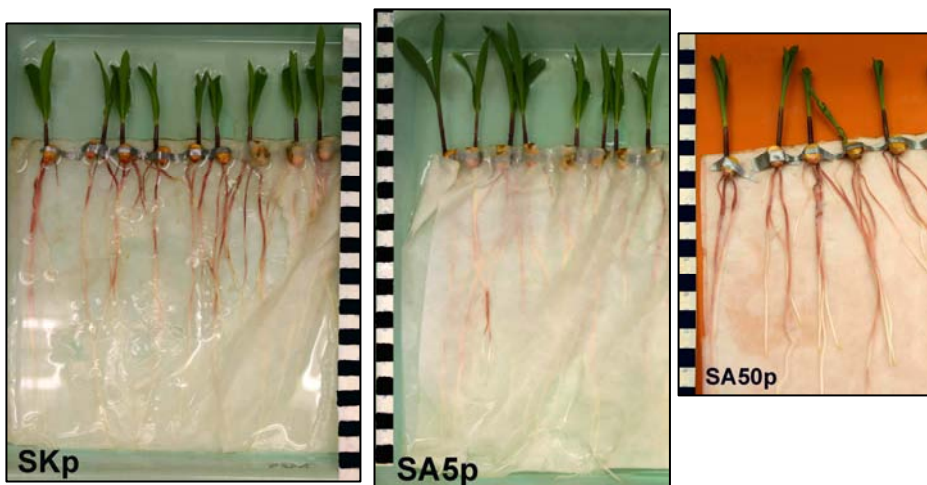
avšak rozdíly byly méně výrazné a nebyly statisticky průkazné (**graf 4.7, 4.8**). Rostliny z kultivace s koncentrací $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ v obou kultivačních místech vytvářely základy třetího listu, kdežto kontrolní rostliny měly listy pouze dva. Rostliny z kultivace SA50p (sledované pouze v kultivační místnosti) měly redukovaný růst listů, průkazně odlišný zejména u hmotnosti sušiny (**graf X.8, tab. 4.7, obr. 4.6**).



Obr. 4.5: Porovnání celkového vzhledu rostlin v závěru sedmidenní kultivace v papíru za normálního osvětlení v kultivační místnosti; černý díl na měřítku odpovídá 1cm.

Tab. 4.7: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po sedmi dnech kultivace za normálního osvětlení, papírová kultivace (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

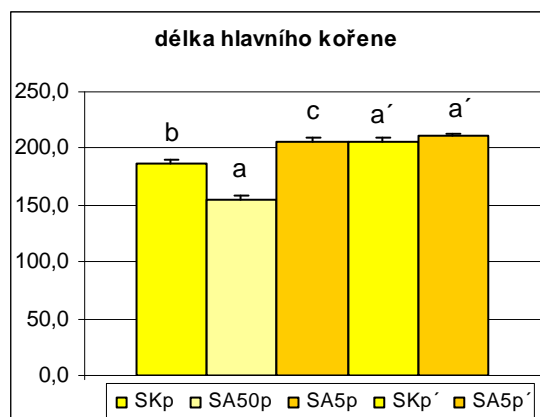
Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SKp		SA50p		SA5p		
Místo kultivace	konstantka		konstantka		konstantka		
délka listů [mm]	69,152 ± 1,5073	a	67,647 ± 3,7435	a	83,476 ± 3,1491	b	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,2137 ± 0,0060	ab	0,1943 ± 0,0139	a	0,2325 ± 0,0092	b	p<0,05
hmotnost sušiny listů [g]	0,0239 ± 0,0007	b	0,0192 ± 0,0018	a	0,0293 ± 0,0014	c	p<0,01
délka mezokotylu [mm]			3,9000 ± 0,3302				
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]			0,0160 ± 0,0016				
hmotnost sušiny mezokotylu [g]			0,0015 ± 0,0004				
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4272 ± 0,0087	a	0,4337 ± 0,0270	a	0,3877 ± 0,0086	a	p<0,05
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1981 ± 0,0073	a	0,1874 ± 0,0175	a	0,1770 ± 0,0053	a	ns
Počet použitých rostlin [počet]	34		18 (10 pro mezokotyl)		21		
Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SKp'		SA5p'				
Místo kultivace	klimabox		klimabox				
délka listů [mm]	72,632 ± 2,3184	a'	77,087 ± 2,9660	a'			p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,2434 ± 0,0114	a'	0,2501 ± 0,0117	a'			p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0268 ± 0,0014	a'	0,0282 ± 0,0014	a'			ns
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4627 ± 0,0103	a'	0,4673 ± 0,0121	a'			ns
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1731 ± 0,0062	a'	0,1823 ± 0,0074	a'			ns
Počet použitých rostlin [počet]	20		23				



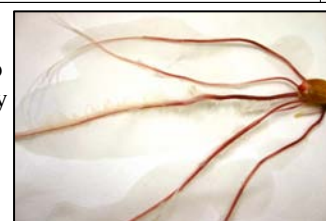
Obr. 4.6: Porovnání celkového vzhledu při sklizni sedm dní starých rostlin z kultivace v papíru za normálního osvětlení v kultivační místnosti; černý díl na měřítku odpovídá 1cm.

Po sedmi dnech kultivace v kultivační místnosti dosahovaly HK za normálních světelných podmínek u kultivace SA50p kratší délky a naopak vliv koncentrace auxinu v kultivaci SA5p byl pro růst hlavních kořenů příznivý (**graf 4.9**). Opět, jako u nadzemních částí rostlin za těchto světelných podmínek, byly rozdíly při kultivaci v klimaboxu nepatrné. U hmotnosti HK, jež byla zjišťována u rostlin pěstovaných v klimaboxu, nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi SKp' a SA5p' (**tab. 4.8**). Zajímavým zjištěním je u tohoto

Graf 4.9: Délka hlavního kořene sedmidenních rostlin pěstovaných v papíru za normálního osvětlení [mm], uvedeny SE



Obr. 4.7: Detail načervenalého kořenového systému sedmidenní rostliny pěstované v papíru za normální fotoperiody, v klimaboxu



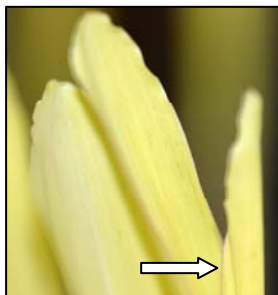
typu kultivace u všech variant červenání kořenů ukládáním antokyanů, zřejmě díky nedostatečnému zabránění průniku světla ke kořenům (**obr. 4.7**).

Tab. 4.8: Biometrické charakteristiky kořenového systému rostlin po sedmi dnech kultivace v papíru, fotoperioda 16/8, (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

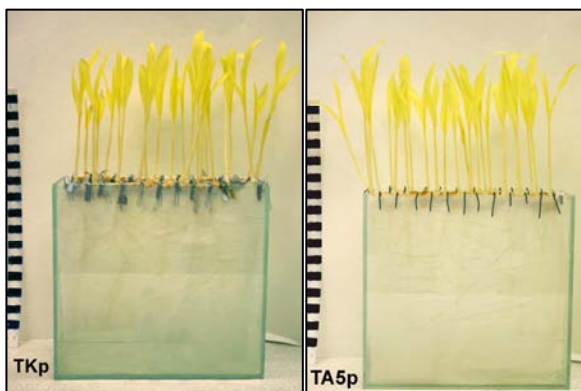
Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SKp		SA50p		SA5p		
Místo kultivace	konstantka		konstantka		konstantka		
délka hlavního kořene [mm]	187,24 ± 3,0060	b	154,88 ± 4,0359	a	206,30 ± 2,9000	c	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	34		16		21		
Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SKp'			SA5p'			
Místo kultivace	klimabox			klimabox			
délka hlavního kořene [mm]	206,85 ± 3,3055	a'	210,70 ± 3,0382	a'			p<0,05
Počet použitých rostlin [počet]	20			23			
čerstvá hmotnost hl. kořene [g]	0,2346 ± 0,0141	a'	0,2089 ± 0,0079	a'			ns
hmotnost sušiny hl. kořene [g]	0,0222 ± 0,0015	a'	0,0208 ± 0,0012	a'			ns
Počet použitých rostlin [počet]	6			7			

4.1.1.2.2. Rostliny pěstované za stálé tmy

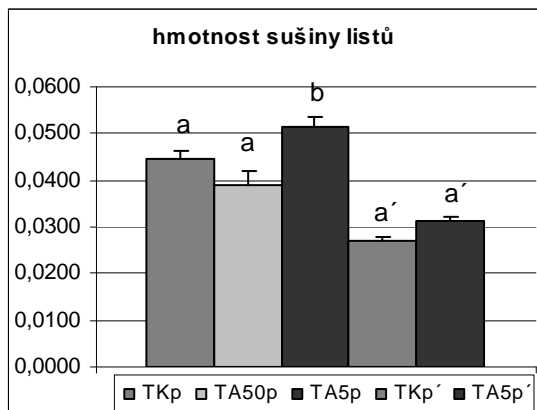
Sedm dní staré etiolované rostliny z obou kultivačních míst nevykazovaly u délky listů žádné ovlivnění růstovým regulátorem. Rozdíly se ukázaly v počtu listů, kdy u kontrolních rostlin se tvořily dva, kdežto rostliny ovlivněné auxinem u kultivace TAp vytvářely základ třetího listu (**obr. 4.9, 4.10**). Rozdíly byly patrné také u hmotnosti sušiny listů mezi TKp a TA5p pocházejících z kultivační místnosti, kdy auxin způsobil statisticky významné zvýšení hmotnosti (**graf 4.10, tab. 4.9**). Zajímavostí v kultivaci TA5p' byly načervenalé okraje jinak světle žlutých (etiolovalých) listů (**obr. 4.8**).



Obr. 4.8: Detail červeného lemování okraje listů varianty TA5p', papírová kultivace, stálá tma



Graf 4.10: Hmotnost sušiny listů [g] sedmidenních rostlin pěstovaných za stálé tmy, papírová kultivace, uvedeny SE

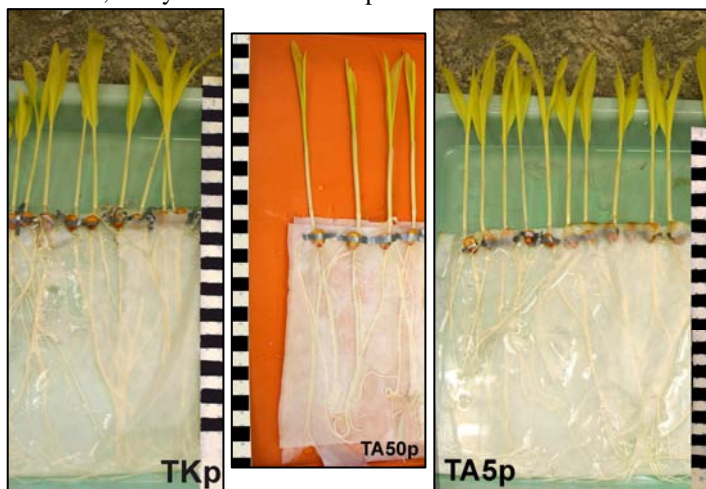


Obr. 4.9: Porovnání celkového vzhledu rostlin v závěru sedmidenní kultivace v papíru, stálá tma, kultivační místnost; černý díl na měřítku odpovídá 1cm.

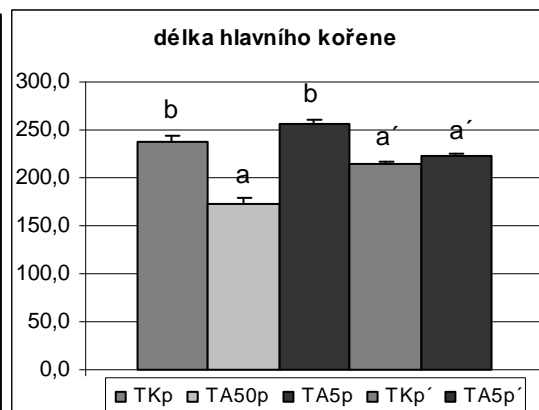
Tab. 4.9: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po sedmi dnech kultivace za stálé tmy, papírová kultivace (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	TKp		TA50p		TA5p		
Místo kultivace	konstantka		konstantka		konstantka		
délka listů [mm]	138,30 ± 3,3401	ab	125,08 ± 2,9332	a	147,27 ± 3,7384	b	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,5265 ± 0,0166	ab	0,4889 ± 0,0318	a	0,5919 ± 0,0195	b	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0447 ± 0,0016	a	0,0391 ± 0,0030	a	0,0516 ± 0,0018	b	p<0,01
délka mezokotylu [mm]	12,667 ± 0,5058	b	14,167 ± 0,7531	b	10,2000 ± 0,5441	a	p<0,01
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,0479 ± 0,0027	a	0,0598 ± 0,0031	b	0,0453 ± 0,0027	a	p<0,01
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0034 ± 0,0002	a	0,0046 ± 0,0003	b	0,0035 ± 0,0003	ab	p<0,01
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4167 ± 0,0087	a	0,4381 ± 0,0413	a	0,4213 ± 0,0125	a	ns
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1376 ± 0,0057	ab	0,1606 ± 0,0176	b	0,1178 ± 0,0050	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	35 (24 pro mezokotyl)		12		22 (10 pro mezokotyl)		
Sledované parametry	Koncentrace				Statistické zhodnocení		
	TKp'		TA5p'				
Místo kultivace	klimabox		klimabox				
délka listů [mm]	82,857 ± 2,5893	ab'	93,043 ± 2,1761	b'	p<0,01		
čerstvá hmotnost listů [g]	0,3026 ± 0,0121	b'	0,3477 ± 0,0114	c'	p<0,01		
hmotnost sušiny listů [g]	0,0270 ± 0,0010	a'	0,0312 ± 0,0010	a'	ns		
délka mezokotylu [mm]	8,4286 ± 0,1853	a'	9,3478 ± 0,2268	b'	p<0,01		
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,0353 ± 0,0013	a'	0,0376 ± 0,0015	a'	ns		
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0027 ± 0,0002	a'	0,0031 ± 0,0002	a'	ns		
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4623 ± 0,0109	a'	0,4476 ± 0,0124	a'	ns		
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1728 ± 0,0059	a'	0,1634 ± 0,0061	a'	ns		
Počet použitých rostlin [počet]	21		23				

Obr. 4.10: Porovnání celkového vzhledu rostlin v závěru sedmidenní kultivace v papíru za stálé tmy, kultivační místnosti; černý díl na měřítku odpovídá 1cm



Graf 4.11: Délka hlavního kořene sedmi dní starých rostlin pěstovaných v papíru za stálé tmy, uvedeny SE [mm]



Výsledky z měření délky HK u rostlin pěstovaných v kultivační místnosti za stálé tmy ukazují snížení růstu při koncentraci $5 \cdot 10^{-10}$ M oproti kontrole (**graf 4.11**). Oproti kultivaci SA5p nebylo pozorováno u TA5p zvýšení délky HK. Rozdíly v délkách HK při kultivaci v klimaboxu byly opět statisticky neprůkazné. Při zjišťování hmotností HK mezi kultivacemi TKp' a TA5p' pocházejících z klimaboxu nebyl opět zjištěn žádný průkazný rozdíl (**tab. 4.10**).

Tab. 4.10: Biometrické charakteristiky kořenového systému rostlin po sedmi dnech kultivace v papíru, stálá tma, (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace			Statistické zhodnocení
	TKp	TA50p	TA5p	
Místo kultivace	konstantka			
délka hlavního kořene [mm]	237,38 ± 6,7664	172,50 ± 6,3470	255,71 ± 3,6646	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	35	12	22	
Sledované parametry	Koncentrace			Statistické zhodnocení
	TKp'	TA5p'		
Místo kultivace	klimabox			
délka hlavního kořene [mm]	213,76 ± 3,3230	222,55 ± 2,9554		p<0,05
Počet použitých rostlin [počet]	21	23		
čerstvá hmotnost hl. kořene [g]	0,2298 ± 0,0081	0,2412 ± 0,0121		ns
hmotnost sušiny hl. kořene [g]	0,0213 ± 0,0008	0,0227 ± 0,0013		ns
Počet použitých rostlin [počet]	7	7		

Dílčí shrnutí vlivu 1-NAA při kultivaci v papíru:

- Byl testován vliv různých koncentrací auxinu na růst kukuřice pěstované pomocí papírových kultur
- Koncentrace $5 \cdot 10^{-10}$ M vykazuje při pěstování v kultivační místnosti srovnatelné či nižší přírůstky oproti kontrolním rostlinám, patrné za různých světelných podmínek u téměř všech orgánů
- Naopak koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M má stimulační vliv na růst rostlin za různých osvětlení
- Zjištěny významné rozdíly ve výsledcích z kultivací z různých kultivačních míst (klimabox vs. kultivační místnost)

4.1.2. Vliv 1-AOA

4.1.2.1. Hydroponická kultivace

Po aplikaci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA došlo u rostlin před uplynutím doby kultivace k zabarvení mezokotylu do červena až fialova a posléze došlo k uhynutí kořenového systému. Tato kultivace byla jednou zopakována se zvýšenou mírou vzduchování, avšak závěr byl stejný. Z důvodu podezření z příliš vysoké koncentrace inhibitoru ethylenu byla vyzkoušena kultivace s poloviční koncentrací inhibitoru, tj. $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$, avšak výsledek byl tentýž. Z časových důvodů nebyl vliv 1-AOA ve vodních kulturách dále sledován.

4.1.2.2. Papírová kultivace

Kontrolní rostliny pěstované papírovou kultivací za normálních světelných podmínek jsem označila „SKp“, za stálé tmy „TKp“. Rostliny, jež rostly v roztoku s danou koncentrací inhibitoru syntézy ethylenu (tab. 4.11) byly označeny při pěstování za normálních podmínek „SIEp“, za stálé tmy „TIEp“. Kultivace s koncentrací $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ byla jednou zopakována. Všechny kultivace byly provedeny v kultivační místnosti.

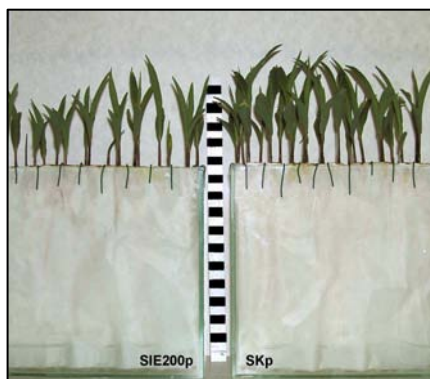
Tab. 4.11: Koncentrace inhibitoru syntézy ethylenu užitá v kultivaci v papíru

1-AOA	c [M]	
koncentrace	$100 \cdot 10^{-6}$	$200 \cdot 10^{-6}$
označení	100p	200p

4.1.2.2.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8

Při kultivaci rostlin za normálních světelných podmínek spolu s inhibitorem ethylenu v koncentraci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ byl zjištěn průkazný rozdíl v charakteristikách listů (obr. 4.11). Největší rozdíly oproti kontrole byly zjištěny u délky (graf 4.12) a čerstvé hmotnosti listů (tab. 4.12). Všechny prýty rostlin pěstovaných za normálních světelných podmínek byly měřeny bez mezokotylu, neboť ty u nich nedosahovaly délky 5mm.

Obr. 4.11: Porovnání celkového vzhledu rostlin v závěru sedmidenní kultivace v papíru, fotoperioda 16/8, kultivační místnost; černý díl na měřítku odpovídá 1cm.



Tab. 4.12: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po sedmi dnech kultivace za normálního osvětlení, papírová kultivace (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SKp		SIE100p		SIE200p		
délka listů [mm]	95,191 ± 3,0736	b	91,875 ± 2,5822	b	75,848 ± 4,2761	a	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,2976 ± 0,0125	b	0,2815 ± 0,0120	ab	0,2455 ± 0,0138	a	p<0,05
hmotnost sušiny listů [g]	0,0378 ± 0,0017	a	0,0364 ± 0,0016	a	0,0332 ± 0,0019	a	ns
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4187 ± 0,0068	b	0,3810 ± 0,0092	a	0,4436 ± 0,0126	b	p<0,01
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1868 ± 0,0049	a	0,1810 ± 0,0056	a	0,2145 ± 0,0165	a	ns
Počet použitých rostlin [počet]	68		24		33		

Podobně jako u listů byly zjištěny rozdíly i u hlavních kořenů (**tab. 4.13**). Velice výrazný byl vliv $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ koncentrace inhibitoru na délku HK pocházejících z rostlin pěstovaných za normální fotoperiody, kde došlo ke snížení oproti kontrole na polovinu. Tentýž trend byl pozorován i u hmotnosti sušiny HK (**tab. 4.13**). Zajímavým zjištěním bylo u varianty SIE200p utváření postranních kořenů, neboť se tvořily pouze u báze HK a vypadaly, alespoň na první pohled, zesílené.

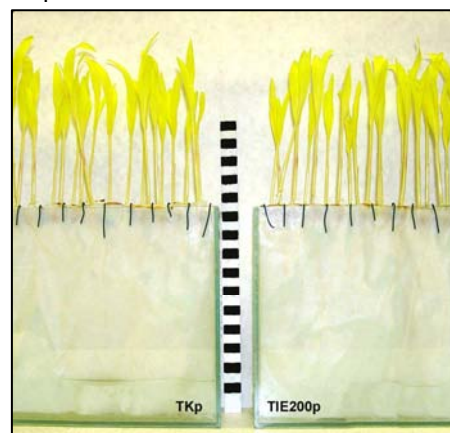
Tab. 4.13: Biometrické charakteristiky kořenového systému rostlin po sedmi dnech kultivace v papíru, fotoperioda 16/8, (uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky)

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	SKp		SIE100p		SIE200p		
délka hlavního kořene [mm]	207,34 ± 5,0799	c	181,81 ± 7,0143	b	107,46 ± 6,7012	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	68		21		35		
čerstvá hmotnost hl. kořene [g]	0,2423 ± 0,0119	b	0,2118 ± 0,0056	b	0,1303 ± 0,0112	a	p<0,01
hmotnost sušiny hl. kořene [g]	0,0244 ± 0,0016	b	0,0201 ± 0,0007	ab	0,0137 ± 0,0009	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	20		6		11		

4.1.2.2.2. Rostliny pěstované za stálé tmy

Při kultivaci rostlin za stálé tmy spolu s inhibitorem tvorby ethylenu v koncentraci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ byl zjištěn průkazný rozdíl v charakteristikách listů (**obr. 4.12**). Největší rozdíl byl zjištěn u jejich délky (**graf 4.12, tab. 4.14**). Kontrolní rostliny za stálé tmy tvořily většinou o jeden ne zcela vyvinutý list více než varianty s $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ AOA (**obr. 4.13**). U poloviční koncentrace 1-AOA však byly také náznaky třetího listu. Zajímavostí byly mezokotyly varianty TIE100p, jejichž střední části byly načervenalé.

Obr. 4.12: Porovnání celkového vzhledu rostlin v závěru sedmidenní kultivace v papíru, fotoperioda 16/8, kultivační místnost; černý díl na měřítku odpovídá 1cm.



Tab. 4.14: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po sedmi dnech kultivace za stálé tmy, papírová kultivace (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

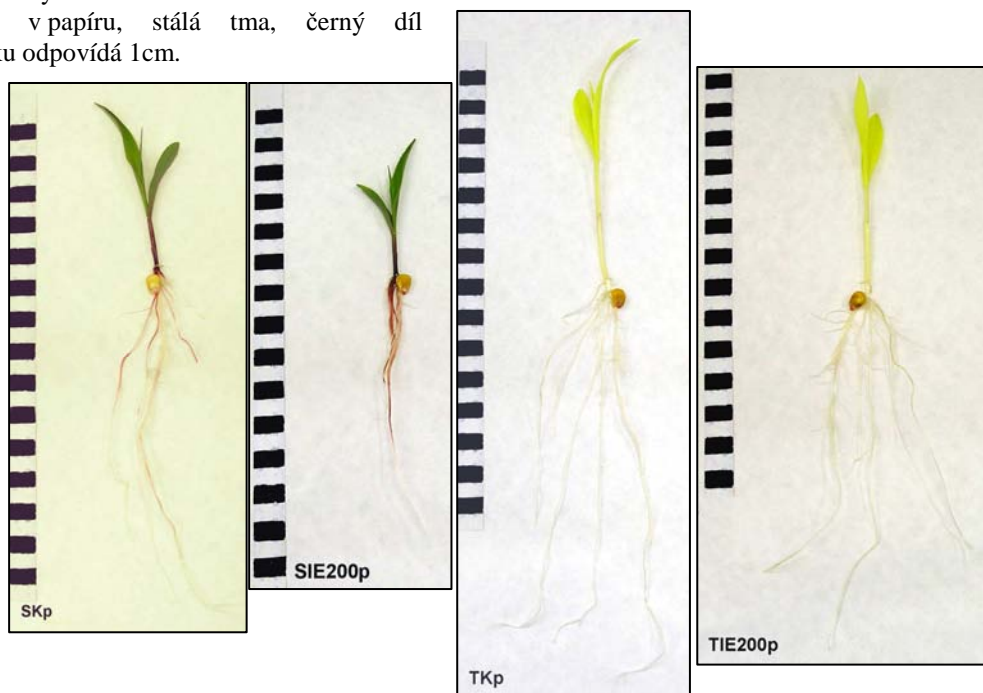
Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	TKp		TIE100p		TIE200p		
délka listů [mm]	150,33 ± 3,3714	b´	164,46 ± 3,7776	b´	133,10 ± 4,3574	a´	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,5716 ± 0,0137	b´	0,5923 ± 0,0168	b´	0,5066 ± 0,0159	a´	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0491 ± 0,0012	ab´	0,0509 ± 0,0014	b´	0,0452 ± 0,0015	a´	p<0,01
délka mezokotylu [mm]	12,725 ± 0,4500	a´			11,725 ± 0,3691	a´	ns
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,0521 ± 0,0018	a´			0,0497 ± 0,0015	a´	ns
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0039 ± 0,0001	a´			0,0043 ± 0,0001	a´	ns
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4324 ± 0,0077	ab´	0,4039 ± 0,0086	a´	0,4417 ± 0,0083	b´	p<0,05
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1273 ± 0,0049	a´	0,4074 ± 0,0108	b´	0,1419 ± 0,0049	a´	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	64 (40 pro mezokotyl)		26		40		

Podobně jako u listů byly zjištěny rozdíly i u hlavních kořenů (**tab. 4.15**). Velice výrazný inhibiční vliv byl pozorován u kultivace TIE200p u jejich délky (**graf 4.13**). Tentýž trend byl pozorován i u hmotnosti sušiny HK (**graf 4.14**).

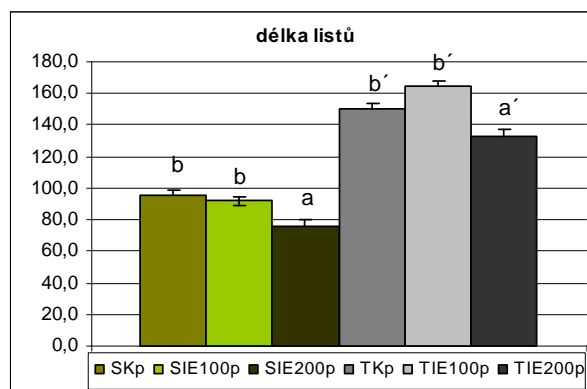
Tab. 4.15: Biometrické charakteristiky kořenového systému rostlin po sedmi dnech kultivace v papíru, stálá tma (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace						Statistické zhodnocení
	TKp		TIE100p		TIE200p		
délka hlavního kořene [mm]	254,14 ± 3,1124	b´	258,73 ± 3,1126	b´	162,95 ± 3,5946	a´	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	64		26		40		
čerstvá hmotnost hl. kořene [g]	0,2637 ± 0,0128	a´	0,2280 ± 0,0083	a´	0,2212 ± 0,0057	a´	ns
hmotnost sušiny hl. kořene [g]	0,0254 ± 0,0011	b´	0,0209 ± 0,0011	ab´	0,0204 ± 0,0016	a´	p<0,05
Počet použitých rostlin [počet]	18		8		11		

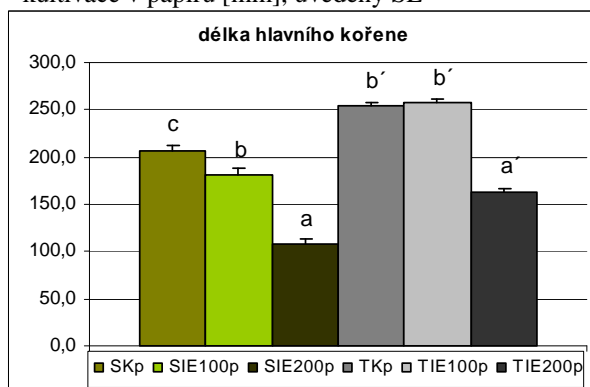
Obr. 4.13: Porovnání celkového vzhledu rostlin různých variant v závěru sedmidenní kultivace v papíru, stálá tma, černý díl na měřítku odpovídá 1cm.



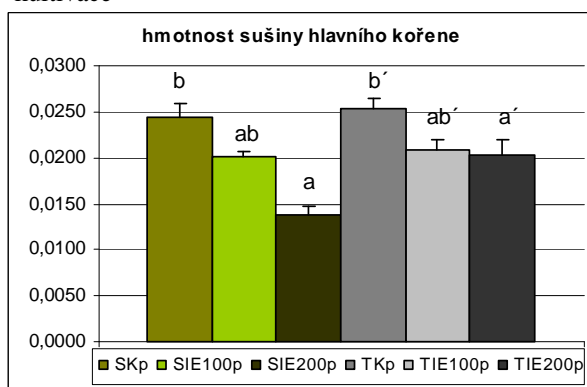
Graf 4.12: Délka listů sedmidenních rostlin pěstovaných v papíru za různých světelných podmínek [mm], uvedeny SE



Graf 4.13: Délka hlavního kořene rostlin pěstovaných za různých světelných podmínek, kultivace v papíru [mm], uvedeny SE



Graf 4.14: Hmotnost sušiny hlavního kořene rostlin pěstovaných za různých světelných podmínek, kultivace



Dílčí shrnutí vlivu 1-AOA při kultivaci v papíru:

- Byl testován vliv různých koncentrací inhibitoru syntézy ethylenu na růst kukuřice pěstované pomocí papírových kultur
- Inhibitor syntézy ethylenu v koncentraci $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$ za různých světelných podmínek vykazuje srovnatelné či nižší přírůstky než kontrolní rostliny
- Dvojnásobná koncentrace inhibitoru výrazně redukuje růst nadzemních i podzemních rostlinných orgánů, a to zejména za normální fotoperiody

4.1.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA

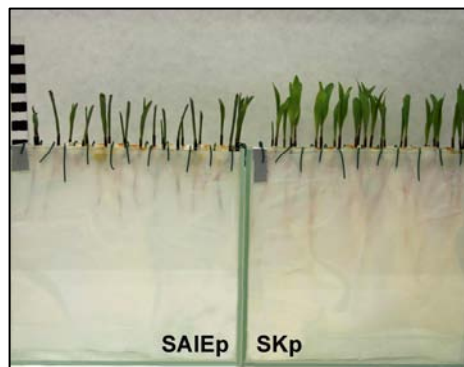
4.1.3.1. Papírová kultivace

Kontrolní rostliny pěstované za normálních světelných podmínek jsem označila **SKp**. Rostliny pěstované za normálních světelných podmínek v médiu spolu s auxinem v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ a inhibitorem syntézy ethylenu v koncentraci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ jsem označila **SAIEp**. Kontrolní rostliny pěstované za stálé tmy pak nesou označení **TKp** a rostliny ze stálé tmy spolu s auxinem a inhibitorem syntézy ethylenu **TAIEp**. Kultivace byla jednou zopakována.

4.1.3.1.1. Rostliny pěstované za fotoperiody 16/8

Rostliny pěstované s kombinací inhibitoru ethylenu s auxinem za podmínek normálního osvětlení měly kratší (**graf 4.15**) a svinutější listy (**obr. 4.14**), počet listů se však od kontroly nelišil. Úbytek byl zjištěn i u čerstvé hmotnosti listů (**tab. 4.16**), avšak u jejich hmotnosti sušiny se nepotvrdil (**graf 4.16**).

Obr. 4.14: Porovnání celkového vzhledu rostlin v závěru sedmidenní kultivace v papíru, fotoperioda 16/8, klimabox; černý díl na měřítku odpovídá 1cm.



Tab. 4.16: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po sedmi dnech kultivace za normálního osvětlení, papírová kultivace (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace		Statistické zhodnocení		
	SKp	SAIEp			
délka listů [mm]	63,707 ± 1,2847	b	50,068 ± 1,1047	a	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,2016 ± 0,0060	b	0,1647 ± 0,0051	a	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0229 ± 0,0007	a	0,0242 ± 0,0007	ab	p<0,01
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4586 ± 0,0095	b	0,4913 ± 0,0079	c	p<0,01
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1934 ± 0,0062	b	0,2252 ± 0,0047	c	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	42		45		

Výrazné rozdíly mezi kontrolou a variantou s auxinem a inhibitorem ethylenu (**tab. 4.17**) byly zjištěny u délky HK (**graf 4.17**). Oproti kontrolním rostlinám došlo působením látek ke snížení délky téměř o 75% a sušina HK těchto rostlin tvořila polovinu hmotnosti kontrolních rostlin (**graf 4.18**). U varianty SAIEp se zdály být na první pohled kořeny mnohem červenější, než tomu bylo u kořenů SKp.

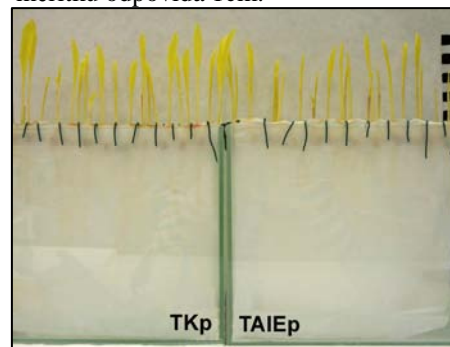
Tab. 4.17: Biometrické charakteristiky kořenového systému rostlin po sedmi dnech kultivace v papíru, fotoperioda 16/8 (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace		Statistické zhodnocení		
	SKp	SAIEp			
délka hlavního kořene [mm]	184,98 ± 2,3334	c	61,267 ± 1,5298	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	42		45		
čerstvá hmotnost hl. kořene [g]	0,2047 ± 0,0076	c	0,0860 ± 0,0057	a	p<0,01
hmotnost sušiny hl. kořene [g]	0,0198 ± 0,0009	c	0,0101 ± 0,0007	a	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	13		13		

4.1.3.1.2. Rostliny pěstované za stálé tmy

Počet listů se mezi variantami z kultivace za stálé tmy nelišil, stejně tak tomu bylo i u jejich délky (graf 4.15). Naopak hmotnost (zejména jejich sušiny) byla při působení auxinu s ethylenem oproti kontrole vyšší (graf 4.16, tab. 4.18). Jako u varianty SAIEp i u TAIep měly rostliny svinuté listy (obr. 4.15) a podobně jako u listů rostlin pěstovaných v papíru se samotným auxinem v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ (obr. 4.9) byly u varianty TAIep pozorovány červeně lemované okraje listů.

Obr. 4.15: Porovnání celkového vzhledu rostlin v závěru sedmidenní kultivace v papíru, stálá tma, klimabox; černý díl na měřítku odpovídá 1 cm.



Tab. 4.18: Biometrické charakteristiky jednotlivých variant po sedmi dnech kultivace za stálé tmy, papírová kultivace (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

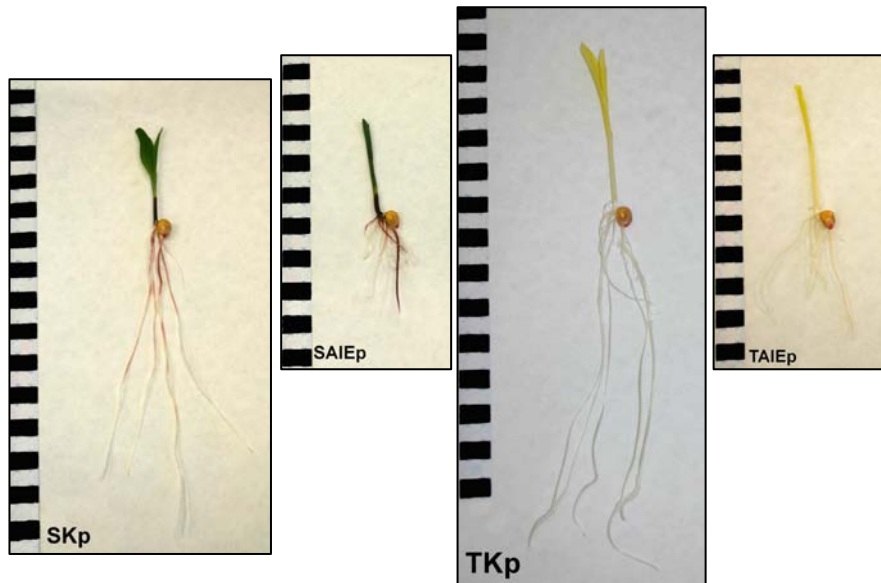
Sledované parametry	Koncentrace				Statistické zhodnocení
	TKp		TAIEp		
délka listů [mm]	81,905 ± 2,0065	c'	83,025 ± 1,5048	c'	p<0,01
čerstvá hmotnost listů [g]	0,2994 ± 0,0081	c'	0,3199 ± 0,0069	c'	p<0,01
hmotnost sušiny listů [g]	0,0262 ± 0,0007	b'	0,0312 ± 0,0008	c'	p<0,01
délka mezokotylu [mm]	9,4878 ± 0,2044	a'	9,0500 ± 0,1998	a'	ns
čerstvá hmotnost mezokotylu [g]	0,0397 ± 0,0011	a'	0,0395 ± 0,0012	a'	ns
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0030 ± 0,0001	a'	0,0039 ± 0,0001	b'	p<0,01
čerstvá hmotnost obilky [g]	0,4625 ± 0,0099	a'	0,4586 ± 0,0078	a'	p<0,01
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1733 ± 0,0058	a'	0,1753 ± 0,0039	a'	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	42		41		

Výrazné rozdíly mezi variantami byly zjištěny, podobně jako u rostlin za fotoperiody 16/8, u HK (tab. 4.19, obr. 4.16). Oproti kontrolním rostlinám došlo při společné aplikaci 1-NAA + 1-AOA ke snížení délky HK téměř o polovinu (graf 4.17), u hmotnosti sušiny došlo ke snížení o čtvrtinu na rozdíl od kontrol (graf 4.18). Varianta TAIep měla HK téměř bez vytvořených PK a u špiček HK se vytvořila neobvyklá ztlustlina.

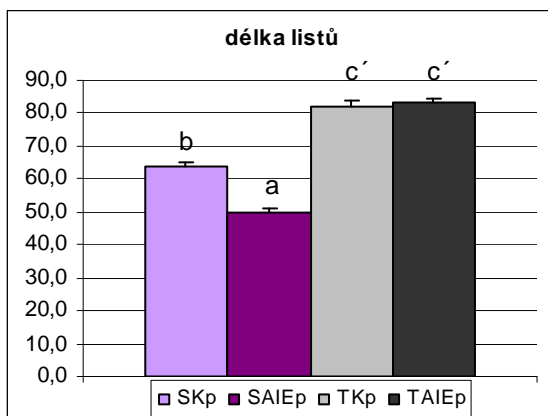
Tab. 4.19: Biometrické charakteristiky kořenového systému rostlin po sedmi dnech kultivace v papíru, stálá tma (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledované parametry	Koncentrace				Statistické zhodnocení
	TKp		TAIEp		
délka hlavního kořene [mm]	207,64 ± 2,2225	d'	118,90 ± 4,9793	b'	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	42		41		
čerstvá hmotnost hl. kořene [g]	0,2353 ± 0,0080	d'	0,1387 ± 0,0078	b'	p<0,01
hmotnost sušiny hl. kořene [g]	0,0215 ± 0,0008	c'	0,0141 ± 0,0005	b'	p<0,01
Počet použitých rostlin [počet]	13		12		

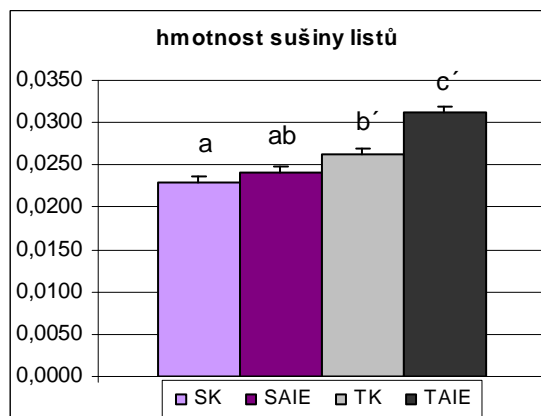
Obr. 4.16: Porovnání celkového vzhledu rostlin různých variant v závěru sedmidenní kultivace v papíru za různých světelných podmínek, černý díl na měřítku odpovídá 1cm.



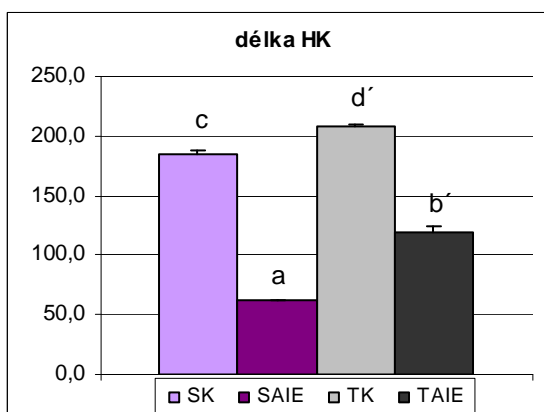
Graf 4.15: Délka listů sedmidenních rostlin pěstovaných v papíru za různých světelných podmínek [mm], uvedeny SE



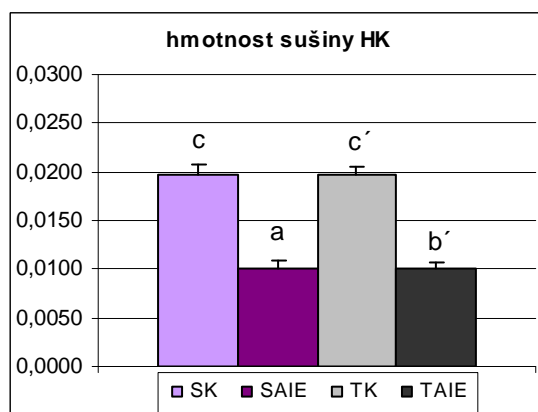
Graf 4.16: Hmotnost sušiny listů sedmidenních rostlin pěstovaných v papíru za různých světelných podmínek [g], uvedeny SE



Graf 4.17: Délka hlavního kořene sedmidenních rostlin pěstovaných za různých osvětlení papírovou kultivací [mm], uvedeny SE



Graf 4.18: Hmotnost sušiny hlavního kořene sedmidenních rostlin pěstovaných za různých osvětlení papírovou kultivací [g], uvedeny SE



Dílčí shrnutí vlivu 1-NAA s 1-AOA při kultivaci v papíru:

- Byl testován vliv kombinace auxinu ($5 \cdot 10^{-11} \text{M}$) a inhibitoru syntézy ethylenu ($200 \cdot 10^{-6} \text{M}$) na růst kukuřice pěstované pomocí papírových kultur
- Kombinace auxinu s inhibitorem ethylenu za normálního osvětlení působí redukci délky listů a velmi výrazné snížení délky a hmotnosti sušiny HK (došlo ke snížení o více než polovinu)
- Za stálé tmy působí kombinace těchto látek zvýšení hmotnosti sušiny listů a výraznou redukci (menší než u rostlin pěstovaných za normální fotoperiody) délky a hmotnosti sušiny HK

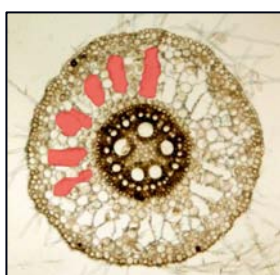
Celkové shrnutí růstových pokusů:

- Byly popsány změny růstových charakteristik rostlin pěstovaných za různých světelných podmínek ve dvou kultivačních místnostech. Obecně nejvíce citlivé na aplikované látky byly většinou rostliny pěstované za normální fotoperiody.
- Ve vodních kultivacích konaných v kultivační místnosti byl popsán na dávce závislý negativní vliv auxinu aplikovaném v koncentracích $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$, $1 \cdot 10^{-9} \text{M}$, $5 \cdot 10^{-10} \text{M}$ a $1 \cdot 10^{-10} \text{M}$ na růst jednotlivých částí rostlin, negativní vliv koncentrace $5 \cdot 10^{-10} \text{M}$ byl potvrzen i v kultivaci v papíru ze stejného kultivačního místa. Obecně větší rozdíly byly patrné u rostlin z normální fotoperiody
- Auxin v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ působil oproti ostatním koncentracím stimulaci růstu jednotlivých částí rostlin za obou použitých koncentrací, a to jak v hydroponii tak při kultivaci v papíru. Rozdíly ve výsledcích byly zjištěny mezi kultivačními místy, klimabox neukazoval mezi variantami příliš mnoho statisticky významných rozdílů
- Inhibitor syntézy ethylenu v závislosti na použité koncentraci ($200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ a $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$) výrazně redukoval růst rostlin v papíru v kultivační místnosti, zejména při normálním osvětlení
- Kombinace auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu ($5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA + $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA) způsobily rostlinám z klimaboxu zvýšení hmotnosti sušiny listů a naopak výraznou redukci růstu podzemních orgánů, patrnou převážně u rostlin z fotoperiody 16/8.

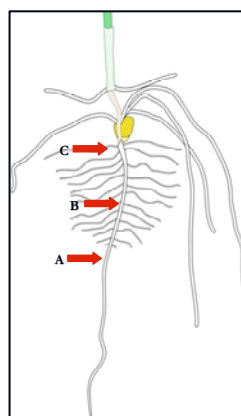
4.2. Analýza plochy aerenchymu

4.2.1. Vliv 1-NAA

Pomocí obrazové analýzy na snímcích z ručních řezů (**obr. 4.17**) pocházejících ze tří vybraných oblastí (**obr. 4.18**) bylo sledováno zastoupení aerenchymu v primární kůře HK rostlin kontrolních a rostlin ovlivněných přidavkem auxinu v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$. Rostliny s touto koncentrací auxinu byly jednak kultivovány v kutlivační místnosti, jednak v klimaboxu, kde byla kultivace jednou zopakována. Označení variant je shodné s označením použitým v kapitole 4.1.²



Obr. 4.17: Měření plochy aerenchymu pomocí obrazové analýzy v programu Lucia G na snímku ručního řezu

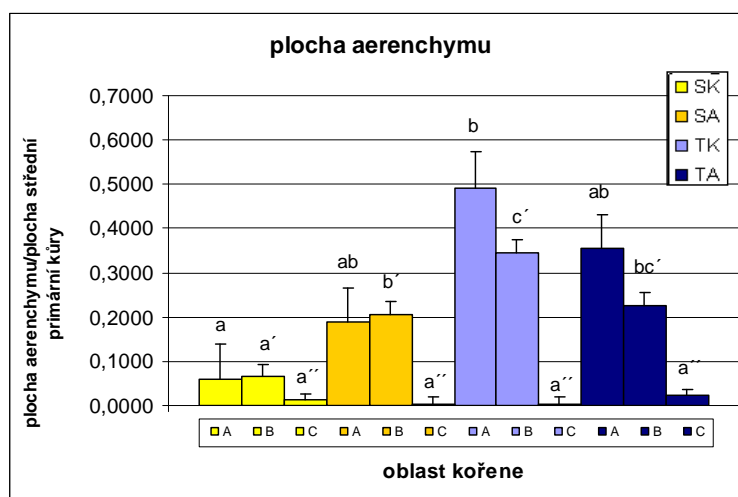


Obr. 4.18: Oblasti vybrané pro měření plochy aerenchymu u HK

A: polovina hlavního kořene,
B: třičtvrtina hlavního kořene,
C: báze hlavního kořene

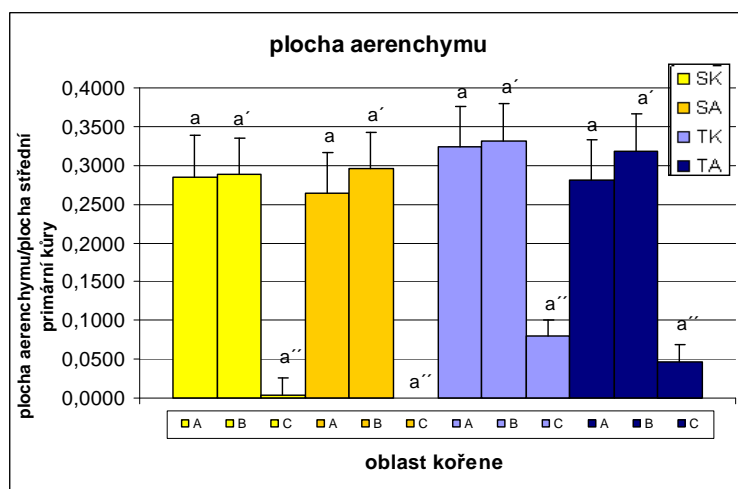
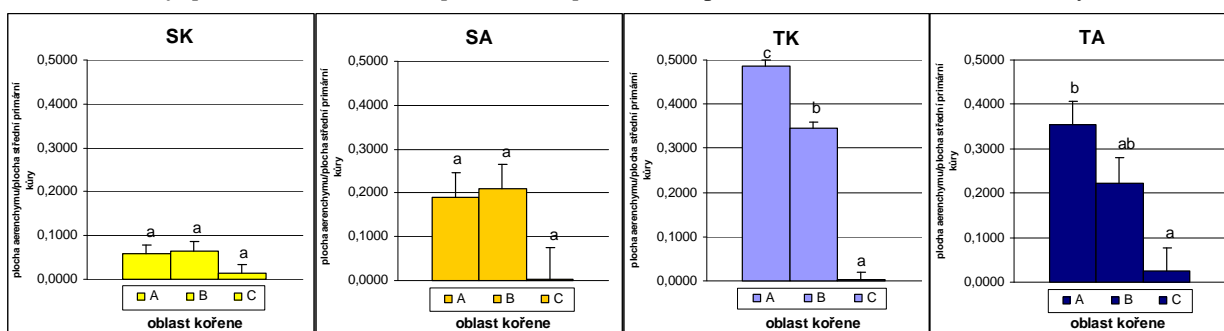
U všech rostlin kultivovaných v kutlivační místnosti se v oblasti báze tvořilo minimální množství aerenchymu (**graf 4.19**). Mezi kontrolními rostlinami z normálních světelných podmínek a ze stálé tmy byl pozorován rozdíl v tvorbě aerenchymu mezi oblastmi A a B. Na rozdíl od varianty SK, kde se tvořilo v těchto dvou oblastech poměrně stejné množství aerenchymu, ve variantě TK byla zjištěna jeho rozsáhlejší tvorba v oblasti A. Při aplikaci auxinu v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ k rostlinám pěstovaným za fotoperiody 16/8 došlo k dvojnásobnému, statisticky průkaznému zvýšení tvorby aerenchymu v oblastech A i B, na rozdíl od oblasti C, kde byla podobná tvorba jako u kontrol. Při aplikaci stejné koncentrace auxinu k rostlinám vystaveným stálé tmě došlo oproti příslušné kontrole k výraznému snížení tvorby aerenchymu (opět nejvíce aerenchymu nalezeno v oblasti A, nejméně v oblasti C), nicméně rozsah aerenchymu byl i u této varianty vyšší než u variant z fotoperiody 16/8 (**graf 4.20**).

² vysvětlivky: SK/TK=světlo/tma kontrola; SA/TA=světlo/tma daná koncentrace auxinu; SIE/TIE=světlo/tma daná koncentrace inhibitoru syntézy ethylenu; SAIE/TAIE=světlo/tma současná aplikace dané koncentrace auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu



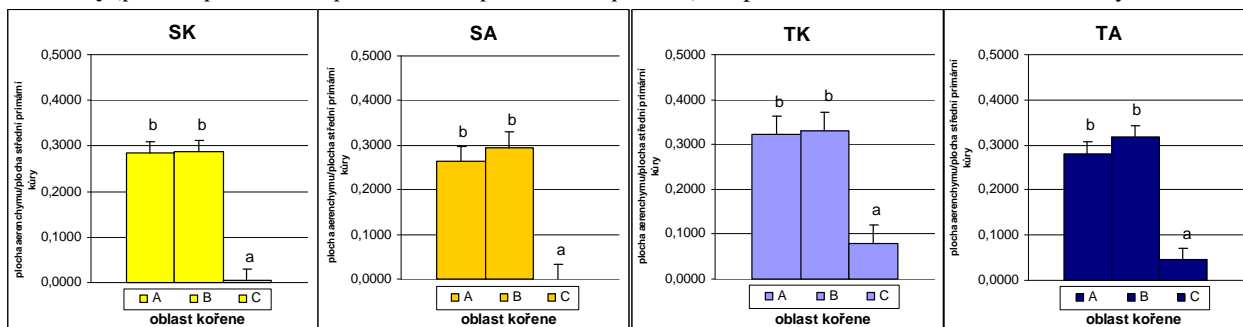
Graf 4.19: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře v dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA (pro A $p < 0,05$; B $p < 0,01$; C ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE

Graf 4.20: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře u jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK ns; SA ns; TK $p < 0,01$; TA $p < 0,05$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.21: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře v dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA; (pro A ns; B ns; C ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE

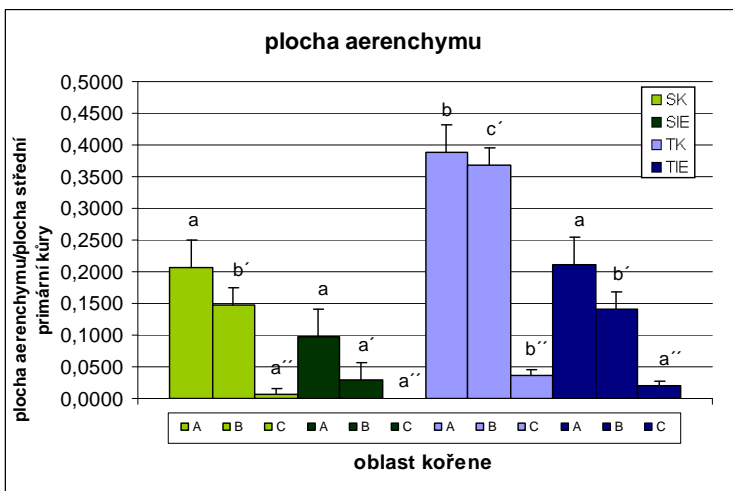
Graf 4.22: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře u jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK $p < 0,01$; SA $p < 0,01$; TK $p < 0,01$; TA $p < 0,01$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Na rozdíl od kultivace v kultivační místnosti při pěstování rostlin v klimaboxu byly zjištěné hodnoty u všech variant dosti vyrovnané. U rostlin ze stálé tmy došlo k vyšší tvorbě aerenchymu v oblasti báze, avšak rozdíl mezi výsledky nebyl statisticky prokázán (graf 4.21, 4.22).

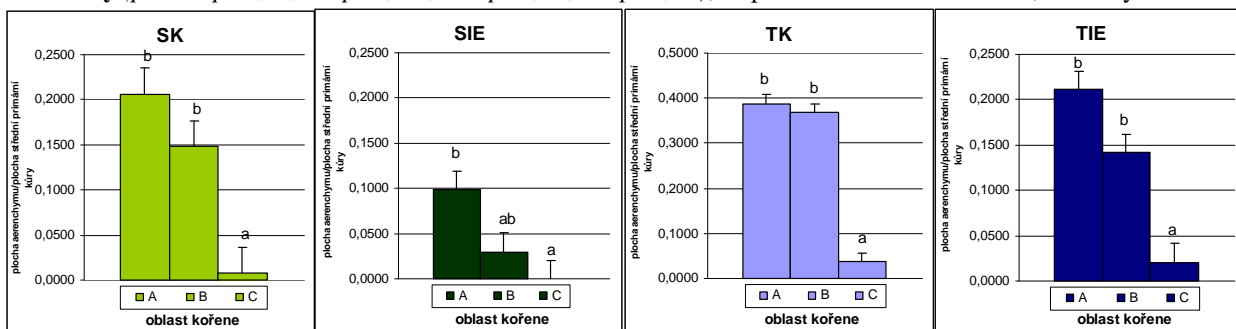
4.2.2. Vliv 1-AOA

Při pokusech s aplikací různých koncentrací inhibitoru syntézy ethylenu byly rostliny pěstovány v obou opakováních v kultivační místnosti. Mezi SK a TK byl zjištěn obdobný trend, jaký byl pozorován u kultivací s auxinem v kultivační místnosti. Podobně jako v předchozích kultivacích, i v tomto případě se potvrdilo, že v oblasti C dochází k minimální tvorbě aerenchymu (graf 4.23).



Graf 4.23: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře v dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SIE, TIE použita koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA (pro A $p < 0,01$; B $p < 0,01$; C $p < 0,05$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE

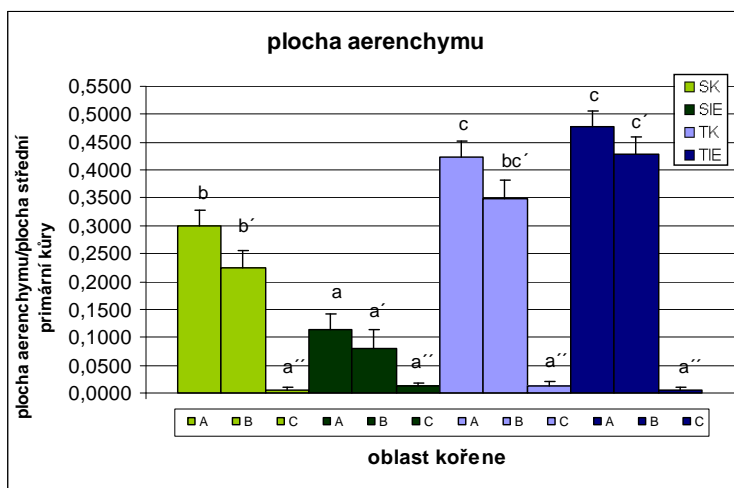
Graf 4.24: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře u jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK $p < 0,01$; SA $p < 0,01$; TK $p < 0,01$; TA $p < 0,01$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Při použití koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA u rostlin za normálních světelných podmínek (varianta SIE) došlo k inhibici tvorby aerenchymu, a to ve všech oblastech HK (graf 4.23). Při aplikaci stejné koncentrace inhibitoru k rostlinám pěstovaným po celou

dobu trvání kultivace ve tmě došlo oproti příslušné kontrole ke statisticky významnému snížení tvorby aerenchymu, a to ve všech oblastech HK. U všech variant se však nejvíce aerenchymu tvořilo v oblasti A a nejméně v oblasti C (**graf 4.24**).

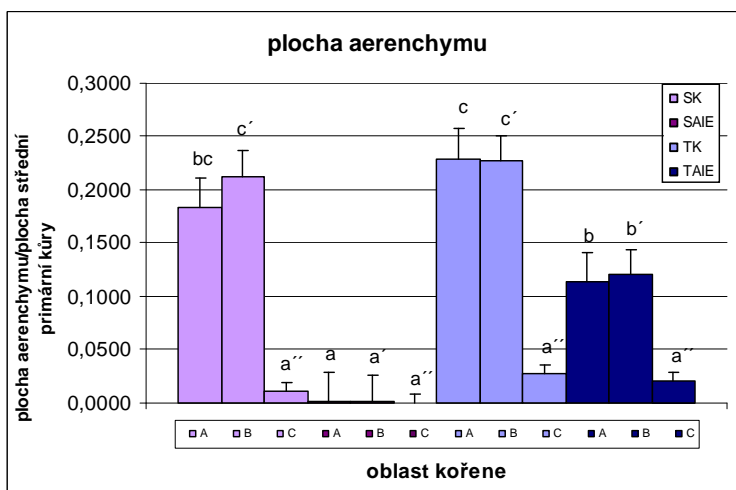
Při aplikaci poloviční koncentrace inhibitoru syntézy ethylenu byl výskyt aerenchymu u kořenů rostlin pěstovaných při fotoperiodě 16/8 obdobný jako u vyšší použité koncentrace. U kořenů z variant pěstovaných za stálé tmy došlo však k vyrovnání rozdílů, tyto rostliny tvořily obdobné množství aerenchymu (**graf 4.25**).



Graf 4.25: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře v dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SIE, TIE použita koncentrace $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; (pro A $p < 0,01$; B $p < 0,01$; C ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE

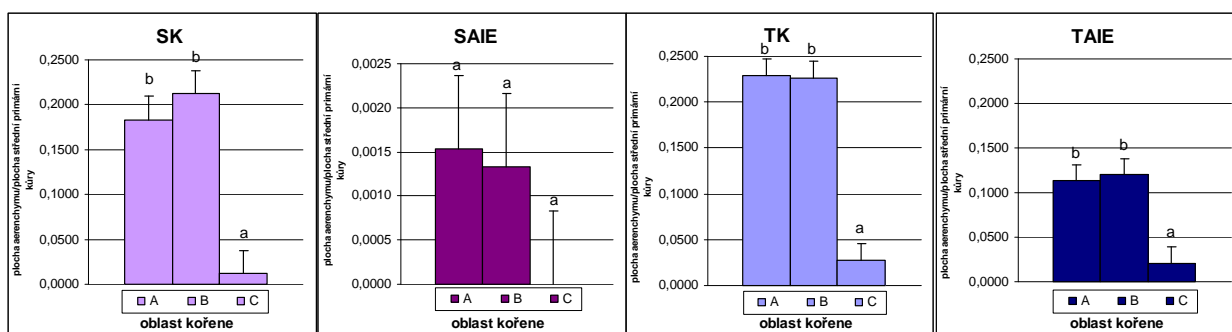
4.2.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA

Při testování vlivu kombinace auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu byly rostliny pěstovány v klimaboxu. Mezi variantami kontrolních kořenů nebyly zjištěny žádné rozdíly a v oblasti C se u TK i TAIE tvořilo větší, ačkoliv nikoli statisticky významné, množství aerenchymu než u variant pěstovaných za normální fotoperiody (**graf 4.26**) podobně jako tomu bylo u pokusů s aplikací auxinu k rostlinám pěstovaným v klimaboxu. Při aplikaci kombinace těchto dvou látek k rostlinám z fotoperiody 16/8 došlo k téměř úplné inhibici tvorby aerenchymu a hodnoty ze všech tří oblastí kořene se od sebe statisticky nelišily (**graf 4.27**). Taktéž výrazný byl vliv současného působení auxinu a inhibitoru ethylenu na tvorbu aerenchymu u rostlin ze stálé tmy. U těchto rostlin se snížila jeho tvorba o více než polovinu, avšak trend mezi jednotlivými oblastmi byl obdobný jako u kontrolních rostlin (**graf 4.27**).



Graf 4.26: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře v dané oblasti hlavného kořene mezi jednotlivými variantami; u SAIE, TAIE použity koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA, (pro A $p < 0,05$; B $p < 0,05$; C ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE

Graf 4.27: Porovnání zastoupení plochy aerenchymu ve střední primární kůře u jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK $p < 0,01$; SA ns; TK $p < 0,01$; TA $p < 0,01$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Shrnutí vlivu 1-NAA a/nebo 1-AOA na tvorbu aerenchymu:

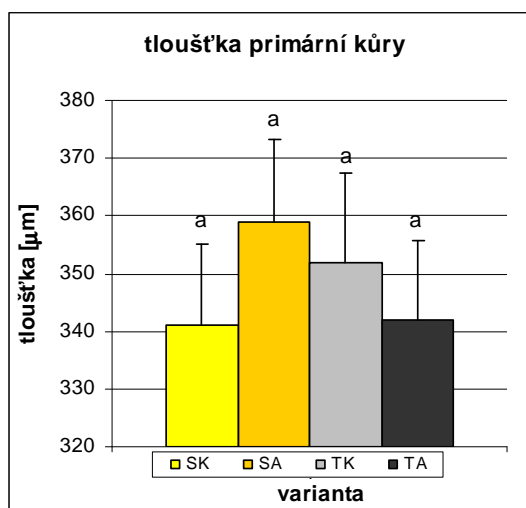
- Byl testován vliv auxinu ($5 \cdot 10^{-11} \text{M}$) a/nebo inhibitoru syntézy ethylenu ($200 \cdot 10^{-6} \text{M}$, popř. $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$) na vytváření aerenchymu v hlavních kořenech kukuřice kultivované v papíru.
- Ve všech sledovaných kultivacích se u kontrolních rostlin v kultivační místnosti tvoří více aerenchymu za stálé tmy než u rostlin z fotoperiody 16/8. Při kultivaci v klimaboxu jsou rozdíly mezi kontrolami nepatrné.
- U žádné ze sledovaných variant za různých světelných podmínek se u báze kořene netvoří téměř žádný aerenchym.
- Poměr mezi jednotlivými oblastmi podél kořene u všech variant zůstal po aplikaci 1-NAA a/nebo 1-AOA zachován, s výjimkou varianty SAIE
- Aplikace 1-NAA v kultivační místnosti působí zvýšení tvorby aerenchymu u variant z normálního osvětlení, a naopak inhibici u variant ze stálé tmy. Při kultivaci v klimaboxu jsou rozdíly mezi variantami nepatrné. Obě použité koncentrace 1-AOA působí v kultivační místnosti inhibici tvorby aerenchymu u obou typů osvětlení. Při současné aplikaci 1-NAA a 1-AOA dochází v klimaboxu k úplné inhibici tvorby aerenchymu za normálního osvětlení a k jejímu výraznému snížení ve stálé tmě.

4.3. Tloušťka primární kůry

4.3.1. Vliv 1-NAA

Tloušťka primární kůry byla zjišťována obrazovou analýzou na snímcích z ručních řezů pocházejících z oblasti báze hlavního kořene (**obr. 4.19**). Označení variant je shodné s označením použitým v předchozích kapitolách. Když byly rostliny kultivovány v kultivační místnosti, bylo pozorováno nepatrné zesílení primární kůry u kontrolních kořenů ze stálé tmy a též u kořenů z normálního osvětlení po přidání auxinu (**graf 4.28**). Mezi těmito výsledky však nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly (**tab. 4.20**).

Obr. 4.19: Zjišťování tloušťky primární kůry pomocí obrazové analýzy

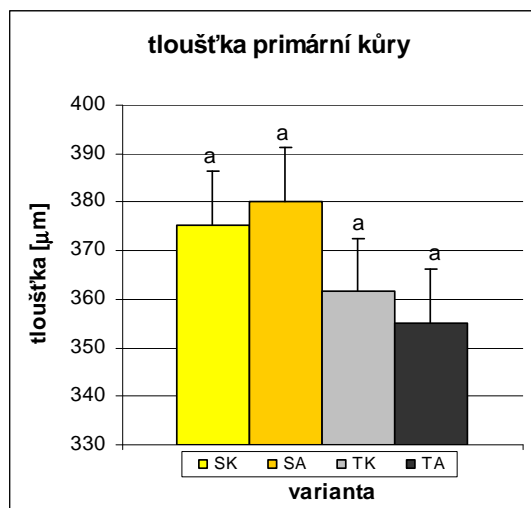


Graf 4.28: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA; výsledky z Repeated Measures ANOVA; uvedeny SE

Tab. 4.20: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA

varianta	1-NAA	Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	341,01	14,034	a ns	4,0237	a ns
SA	358,84	14,526	a ns	3,5989	c ns
TK	351,82	15,690	a ns	4,0237	b ns
TA	341,82	14,034	a ns	3,5989	ab ns

Tloušťka primární kůry kořenů rostlin pěstovaných v klimaboxu vykazovala podobný trend jako při pěstování v kultivační místnosti (**graf 4.29**). U kořenů rostlin ze stálé tmy bylo zjištěno méně výrazné tloušťnutí primární kůry (**tab. 4.21**).



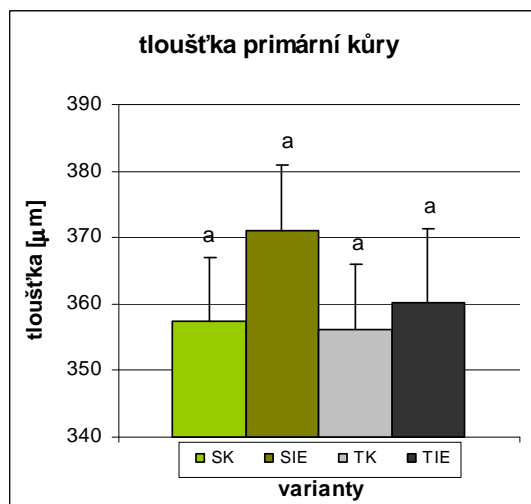
Graf 4.29: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA; výsledky z Repeated Measures ANOVA; uvedeny SE

Tab. 4.21: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA

1-NAA		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA			
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení		
SK	375,40	11,078	a	ns	3,3820	c	ns
SA	380,31	11,078	a	ns	3,3820	c	ns
TK	361,53	11,078	a	ns	3,3820	b	ns
TA	355,01	11,078	a	ns	3,3820	a	ns

4.3.2. Vliv 1-AOA

Pro zjišťování vlivu inhibitoru syntézy ethylenu na tloušťku primární kůry byly použity kořeny rostlin pěstovaných v kultivační místnosti. Po aplikaci 1-AOA došlo ke statisticky průkaznému zesílení primární kůry u rostlin pěstovaných za normálního osvětlení (graf 4.30, tab. 4.22).



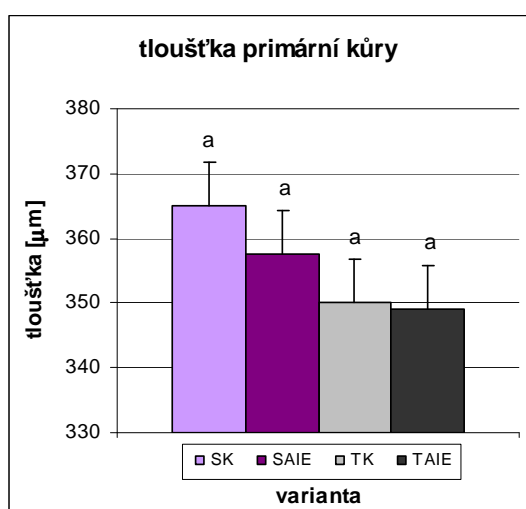
Graf 4.30: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SIE, TIE použita koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; výsledky z Repeated Measures ANOVA; uvedeny SE

Tab. 4.22: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SIE, TIE použita koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA

1-AOA		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA			
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení		
SK	357,32	9,7664	a	ns	2,8259	a	p<0,01
SIE	370,95	9,9333	a	ns	3,2274	b	p<0,01
TK	356,17	9,9333	a	ns	2,8742	a	p<0,01
TIE	360,27	11,154	a	ns	2,8742	a	p<0,01

4.3.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA

Kořeny kontrolních rostlin pěstovaných za stálé tmy v klimaboxu vykazovaly při měření tloušťky primární kůry podobné výsledky (graf 4.31), jaké byly získány v předchozí kultivaci ze stejného kultivačního místa. Při současné aplikaci auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu bylo pozorováno snížení tloušťky primární kůry, a to za obou zkoušených osvětlení. Statistická významnost zjištěných rozdílů však nebyla prokázána (tab. 4.23).



Graf 4.31: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SAIE, TAIE použity koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6}$ M 1-AOA; výsledky z Repeated Measures ANOVA; uvedeny SE

Tab. 4.23: Tloušťka primární kůry v oblasti báze hlavního kořene; u SAIE, TAIE použity koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6}$ M 1-AOA

1-NAA + 1-AOA		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA			
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení		SE	statistické zhodnocení	
SK	365,08	6,6834	a	ns	2,5616	a	ns
SAIE	357,58	6,6834	a	ns	2,5616	b	ns
TK	350,16	6,6834	a	ns	2,5616	b	ns
TAIE	349,17	6,6834	a	ns	2,5616	c	ns

Shrnutí vlivu 1-NAA a/nebo 1-AOA na tloušťku primární kůry:

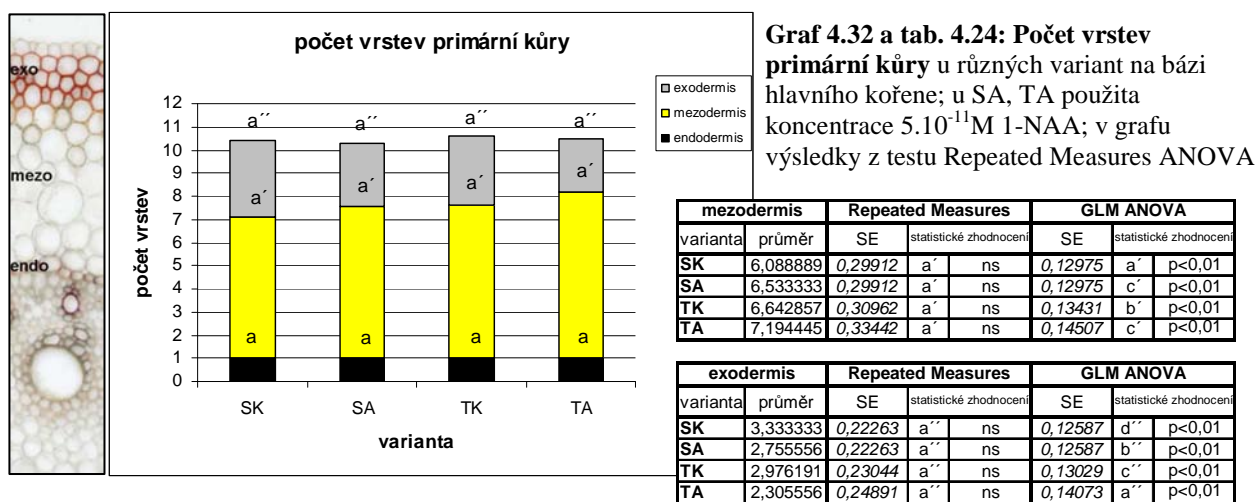
- Byl testován vliv auxinu ($5 \cdot 10^{-11}$ M) a/nebo inhibitoru syntézy ethylenu ($200 \cdot 10^{-6}$ M) na tloušťku primární kůry v oblasti báze hlavních kořenů kukuřice kultivované v papíru.
- Téměř ve všech případech nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi variantami

4.4. Počet vrstev primární kůry

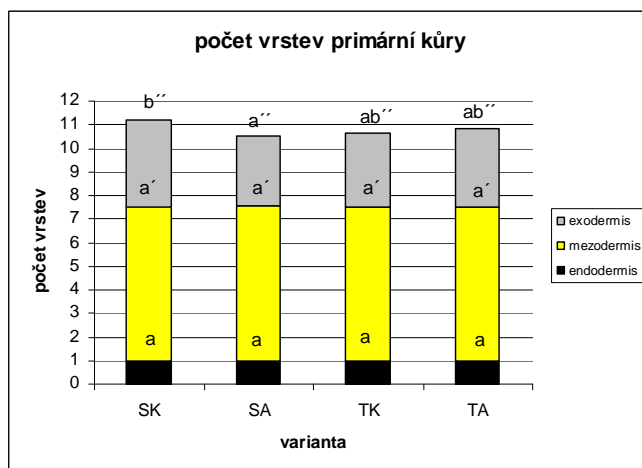
4.4.1. Vliv 1-NAA

Na snímcích z ručních řezů pocházejících z oblasti báze hlavního kořene rostlin pěstovaných v kultivační místnosti i v klimaboxu byl zjišťován počet jednotlivých vrstev primární kůry. Označení variant je shodné s označením použitým v předchozích kapitolách. U kořenů kukuřice (*Zea mays*) se pod pokožkou vytváří vždy exodermis, která je tvořena jednou až několika vrstvami buněk, pod ní se nachází několik vrstev parenchymatických buněk vytvářejících střední vrstvu primární kůry, neboli mezodermis, a jedna vrstva endodermis.

Kontrolní rostliny pěstované v kultivační místnosti za stálé tmy tvořily více vrstev mezodermis a méně vrstev exodermis než kontrolní rostliny pěstované za normálního osvětlení. Po přidání auxinu došlo u obou typů osvětlení rovněž ke zvýšení počtu vrstev mezodermis a snížení počtu vrstev exodermis (**graf 4.32**). Změny v počtu vrstev mezodermis i exodermis ze všech variant byly při testování GLM ANOVA statisticky průkazné (**tab. 4.24**).



Při zjišťování počtu jednotlivých vrstev primární kůry u kořenů rostlin pěstovaných v klimaboxu nebyly na rozdíl od kultivace v kultivační místnosti mezi variantami zjištěny žádné statisticky průkazné rozdíly v počtu vrstev mezodermis či exodermis, a to ani jedním z použitých testů (**graf 4.33, tab. 4.25**).



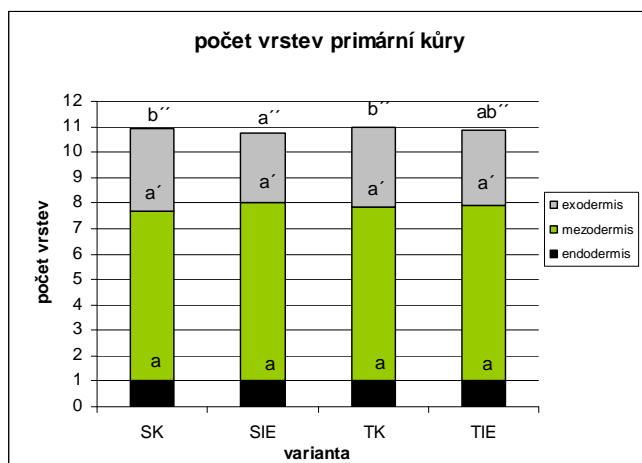
Graf 4.33 a tab. 4.25: Počet vrstev primární kůry u různých variant na bázi hlavního kořene; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA; v grafu výsledky z testu Repeated Measures ANOVA

mezodermis		Repeated Measures		GLM ANOVA			
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení		
SK	6,511111	0,1262	a'	ns	0,12094	b''	ns
SA	6,555555	0,1262	a'	ns	0,12094	d'	ns
TK	6,533333	0,1262	a'	ns	0,12094	c'	ns
TA	6,488889	0,1262	a'	ns	0,12094	a'	ns

exodermis		Repeated Measures		GLM ANOVA			
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení		
SK	3,711111	0,18509	b''	ns	0,10507	d''	ns
SA	2,955555	0,18509	a''	ns	0,10507	a''	ns
TK	3,133333	0,18509	ab''	ns	0,10507	b''	ns
TA	3,355556	0,18509	ab''	ns	0,10507	c''	ns

4.4.2. Vliv 1-AOA

Vliv inhibitoru ethyleny na počet vrstev primární kůry byl sledován při koncentraci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ u rostlin pěstovaných v kultivační místnosti (**graf 4.34**). U počtu vrstev mezodermis nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými variantami. U exodermis se kontroly mezi sebou neodlišovaly, avšak po aplikaci inhibitoru se za normálního osvětlení snížil počet vrstev exodermis, což bylo statisticky prokázáno testem Repeated Measures ANOVA (**tab. 4.26**).



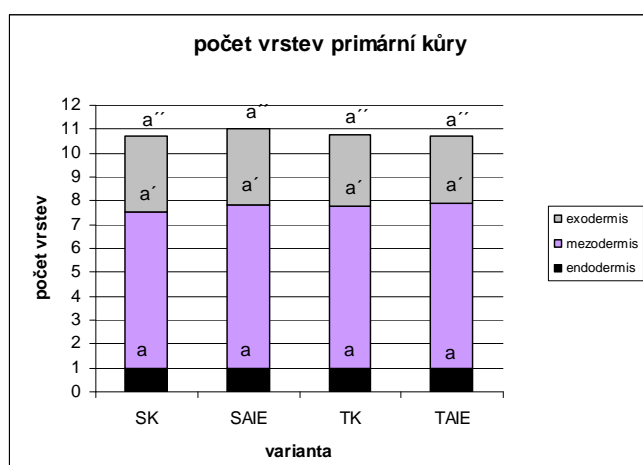
Graf 4.34 a tab. 4.26: Počet vrstev primární kůry u různých variant na bázi hlavního kořene; u SIE, TIE použita koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; v grafu výsledky z testu Repeated Measures ANOVA

mezodermis		Repeated Measures		GLM ANOVA			
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení		
SK	6,655556	0,15922	a'	ns	0,09019	a'	ns
SIE	7,034483	0,16194	a'	ns	0,09174	c'	ns
TK	6,850574	0,16194	a'	ns	0,09174	b'	ns
TIE	6,927536	0,18185	a'	ns	0,10301	a'	ns

exodermis		Repeated Measures		GLM ANOVA			
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení		
SK	3,266667	0,10102	b''	p<0,01	0,08009	b''	ns
SIE	2,689655	0,10275	a''	p<0,01	0,08146	a''	ns
TK	3,149425	0,10275	b''	p<0,01	0,08146	b''	ns
TIE	2,956522	0,11538	ab''	p<0,01	0,09147	b''	ns

4.4.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA

Pro sledování vlivu současného působení auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu byly kultivace provedeny v klimaboxu. Při současné aplikaci těchto látek vykazovaly výsledky týkající se mezodermis podobný trend jako u kultivace s auxinem (kap. 4.4.1.). Prostřednictvím testu GLM ANOVA byla u těchto výsledků zjištěna statistická průkaznost (**tab. 4.27**). Počet vrstev exodermis byl u všech variant velice podobný, ani jedním z použitých testů nebyly zjištěny významné rozdíly mezi variantami (**graf 4.35**).



Graf 4.35 a tab. 4.27: Počet vrstev primární kůry u různých variant na bázi hlavního kořene; u SAIE, TAIE použity koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; v grafu výsledky z testu Repeated Measures ANOVA

mezodermis		Repeated Measures		GLM ANOVA		
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení	
SK	6,533333	0,13948	a'	0,09505	a'	p<0,01
SAIE	6,866667	0,13948	a'	0,09505	c'	p<0,01
TK	6,777778	0,13948	a'	0,09505	b'	p<0,01
TAIE	6,922222	0,13948	a'	0,09505	d'	p<0,01

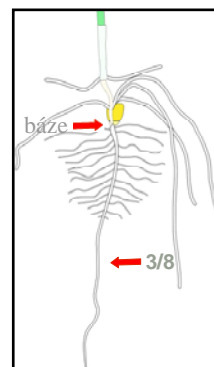
exodermis		Repeated Measures		GLM ANOVA		
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení	
SK	3,20000	0,11245	a''	0,07658	c''	ns
SAIE	3,144444	0,11245	a''	0,07658	b''	ns
TK	2,988889	0,11245	a''	0,07658	b''	ns
TAIE	2,811111	0,11245	a''	0,07658	a''	ns

Shrnutí vlivu 1-NAA a/nebo 1-AOA na počet vrstev primární kůry:

- Byl testován vliv auxinu ($5 \cdot 10^{-11} \text{M}$) a/nebo inhibitoru syntézy ethylenu ($200 \cdot 10^{-6} \text{M}$) na počet vrstev primární kůry hlavních kořenů kukuřice kultivované v papíru.
- Počet vrstev střední primární kůry je ve většině případů mezi variantami stálý, pouze u SK je poněkud nižší
- Počet vrstev exodermis je nepatrně nižší u kontrolních rostlin za tmy oproti variantě SK, po aplikaci 1-NAA či 1-AOA dochází k jen minimálnímu snížení počtu vrstev exodermis při obou použitých osvětleních, statisticky významnému pouze u varianty SIE. Při současné aplikaci 1-NAA a 1-AOA nedosahují výsledky statisticky významných rozdílů.

4.5. Histochemická detekce modifikace buněčných stěn

Na příčných ručních řezech pocházejících ze dvou oblastí hlavního kořene (**obr. 4.20**) barvených floroglucinolem s HCl byla provedena histochemická detekce modifikace buněčných stěn při působení 1-NAA, 1-AOA a 1-NAA + 1-AOA. Po aplikaci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA či $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA nebyly u rostlin za obou zkoušených osvětlení u počtu vrstev exodermis



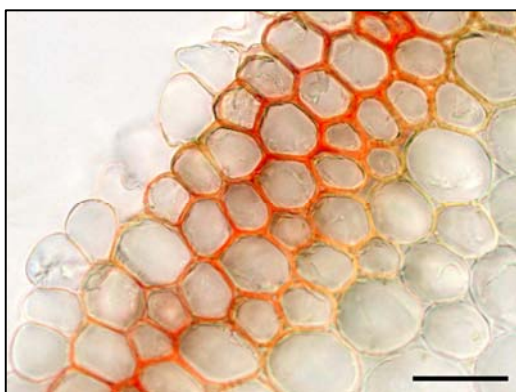
Obr. 4.20:
Oblasti na hlavním kořeni použité pro histochemickou detekci modifikace buněčných stěn

v oblasti 3/8 HK zjištěny rozdíly. Ve všech variantách se tvořila jedna vrstva exodermis, avšak při současné aplikaci 1-NAA a 1-AOA došlo ve stejné oblasti HK rostlin pěstovaných za normální fotoperiody ke zvýšení počtu vrstev exodermis (varianta SAIE). Výsledky získané z oblasti báze souhlasí s výsledky ze zjišťování počtu vrstev exodermis získanými pomocí obrazové analýzy (kap. 4.4.). Výsledky z kultivace rostlin s koncentrací $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA v kultivační místnosti a z varianty SIE nebyly zjišťovány.

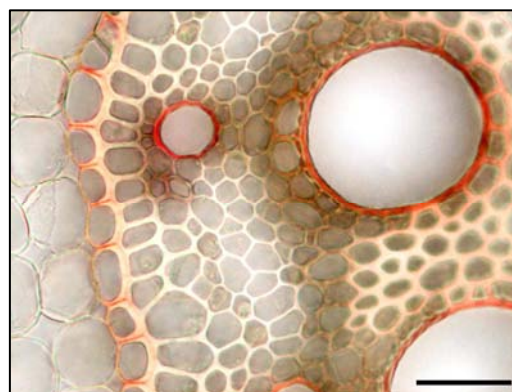
Obr. 4.21: Dva postranní kořeny prorostlé rodičovským kořenem, úsečka = $100 \mu\text{m}$



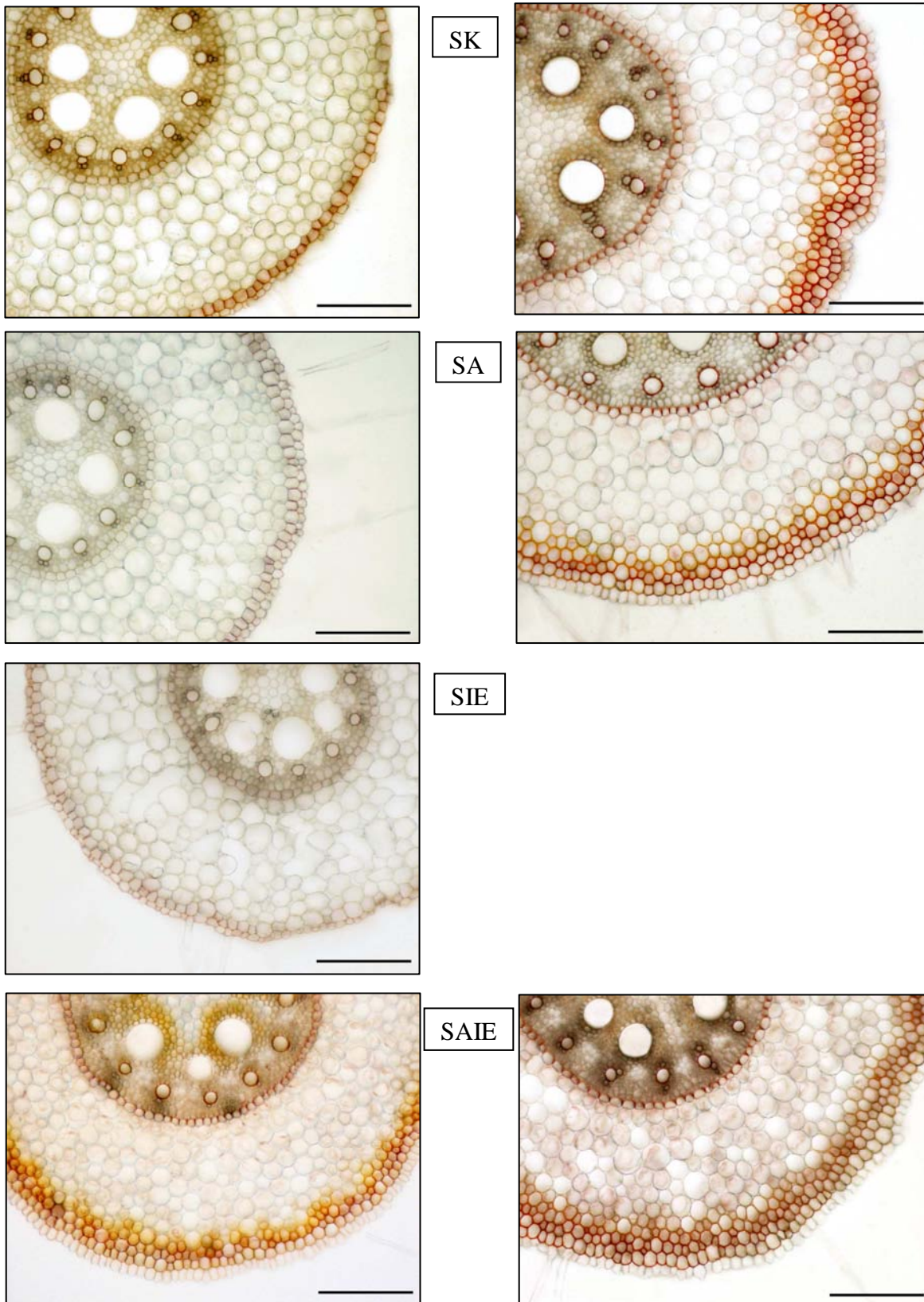
Obr. 4.22: Detail mnohvrstevné exodermis, úsečka = $20 \mu\text{m}$



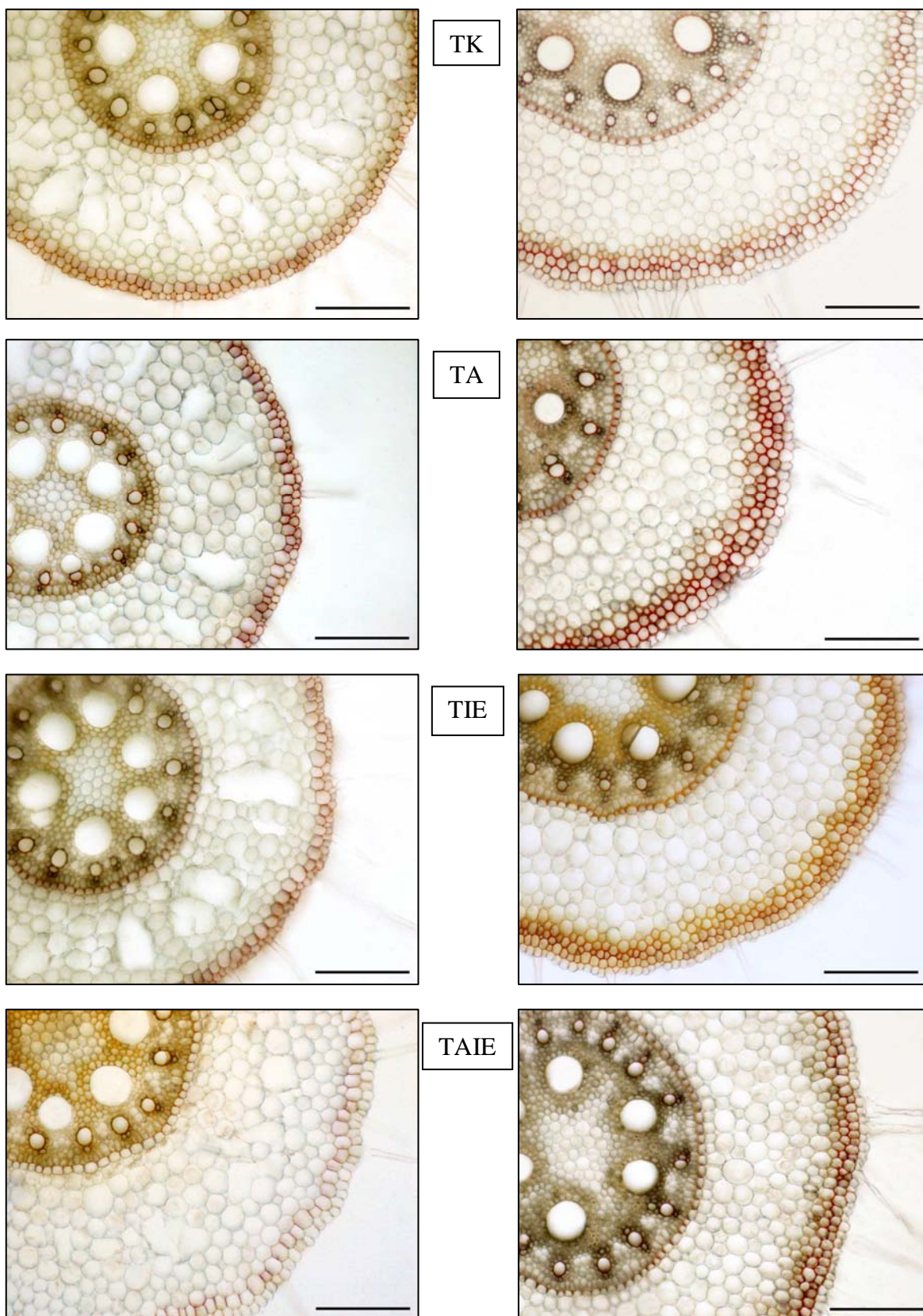
Obr. 4.23: Detail jednovrstevné endodermis, úsečka = $20 \mu\text{m}$



Obr. 4.24: Vizualizace apoplastických bariér v kořenech rostlin pěstovaných za normální fotoperiody; řezy pocházejí z oblasti 3/8 (vlevo) a báze (vpravo) hlavního kořene, úsečka = 100 μ m



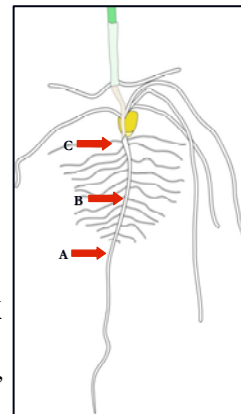
Obr. 4.25: Vizualizace apoplastických bariér v kořenech rostlin pěstovaných za stálé tmy; řezy pocházejí z oblasti 3/8 (vlevo) a báze (vpravo) hlavního kořene, úsečka = 100 μ m.



4.6. Počet cév pozdního metaxylému

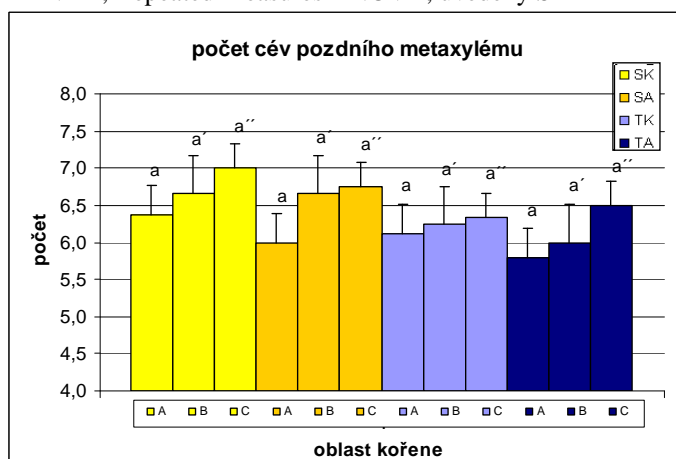
4.6.1. Vliv 1-NAA

Počet cév pozdního metaxylému byl zjišťován pomocí snímků trvalých preparátů pocházejících ze tří různých oblastí hlavního kořene (obr. 4.26). Označení variant je shodné s označením použitým v předchozích kapitolách.

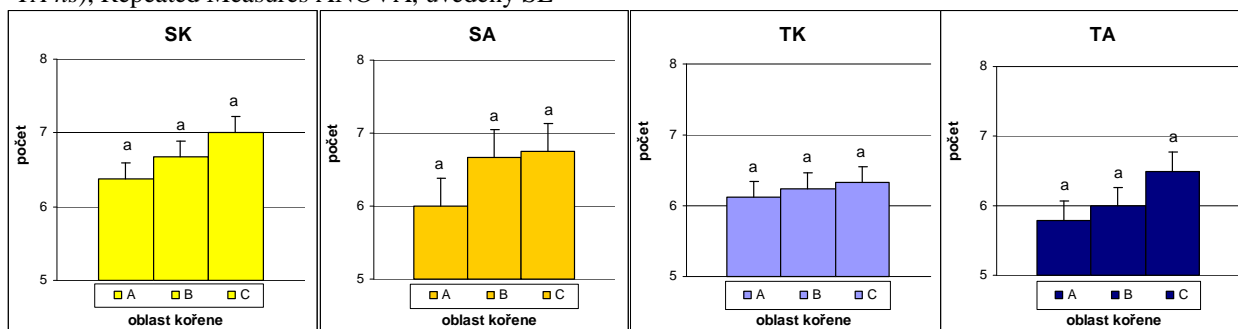


Obr. 4.26: Oblasti vybrané pro zjišťování počtu cév pozdního metaxylému u HK
A: polovina hlavního kořene,
B: třičtvrtina hlavního kořene,
C: báze hlavního kořene

Graf 4.36: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SA,TA použita koncentrace $5.10^{-11}M$ 1-NAA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.37: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK ns; SA ns; TK ns; TA ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Tab. 4.28: Počet cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SA,TA použita koncentrace $5.10^{-11}M$ 1-NAA; kultivační místnost

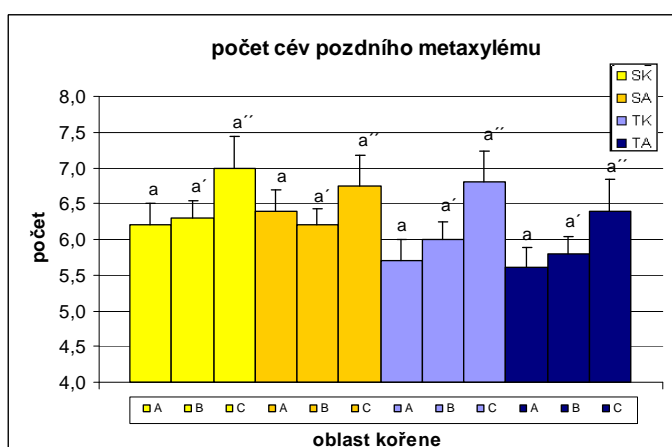
1-NAA OBLAST A		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	6,38	0,3925	a ns	0,0722	c p<0,01
SA	6,00	0,3925	a ns	0,0722	b p<0,01
TK	6,13	0,3925	a ns	0,0722	b p<0,01
TA	5,79	0,3925	a ns	0,0722	a p<0,01

1-NAA OBLAST B		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	6,67	0,5086	a ns	0,0754	b p<0,01
SA	6,67	0,5086	a ns	0,0754	a p<0,01
TK	6,25	0,5086	a ns	0,0754	a p<0,01
TA	6,00	0,5086	a ns	0,0754	a p<0,01

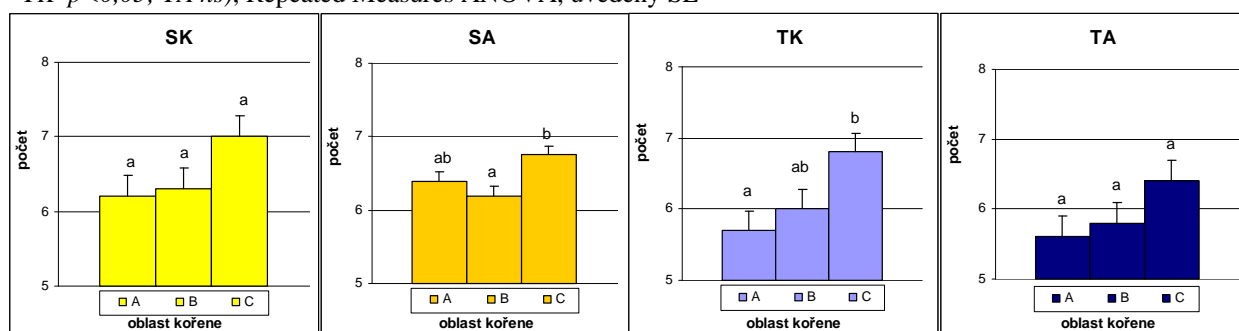
1-NAA OBLAST C		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	7,00	0,3254	a ns	0,0435	b p<0,01
SA	6,75	0,3254	a ns	0,0435	b p<0,01
TK	6,33	0,3254	a ns	0,0435	b p<0,01
TA	6,50	0,3254	a ns	0,0435	a p<0,01

Při sledování, jak auxin v koncentraci $5.10^{-11}M$ ovlivňuje počet cév pozdního metaxylému, byly rostliny pěstovány v kultivační místnosti i v klimaboxu. Při pěstování rostlin v kultivační místnosti byly pozorovány změny v počtu cév podél osy kořene, nejméně cév se vyskytovalo v oblasti A, nejvíce pak v oblasti C. Charakter těchto změn byl pozorován u všech variant, rozdíly však za těchto kultivačních podmínek nebyly statisticky průkazné (graf 4.37, tab. 4.28). V kontrolních kořenech rostlin pěstovaných za stálé tmy se tvořilo méně cév. Přidání auxinu do média způsobilo snížení počtu cév patrné u rostlin z obou typů osvětlení v oblasti A, stejně tak za normálního osvětlení v oblasti C a za stálé tmy v oblasti B (graf 4.36, tab. 4.28).

Graf 4.38: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SA,TA použita koncentrace $5.10^{-11}M$ 1-NAA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.39: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK ns; SA $p < 0,05$; TK $p < 0,05$; TA ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Při pěstování rostlin v klimaboxu byl zjištěn u většiny variant obdobný trend v počtu cév podél osy kořene, s nejvyšším počtem cév v oblasti báze. U variant SA a TK však oproti předchozí kultivaci byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými oblastmi (graf 4.39). Testování pomocí GLM ANOVA ukázalo statisticky

Tab. 4.29: Počet cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SA,TA použita koncentrace $5.10^{-11}M$ 1-NAA; klimabox

1-NAA OBLAST A		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	6,20	0,2958	a ns	0,0000	a $p < 0,01$
SA	6,40	0,2958	a ns	0,0000	a $p < 0,01$
TK	5,70	0,2958	a ns	0,0000	a $p < 0,01$
TA	5,60	0,2958	a ns	0,0000	a $p < 0,01$

1-NAA OBLAST B		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	6,30	0,2345	a ns	0,0542	b ns
SA	6,20	0,2345	a ns	0,0542	a ns
TK	6,00	0,2345	a ns	0,0542	a ns
TA	5,80	0,2345	a ns	0,0542	a ns

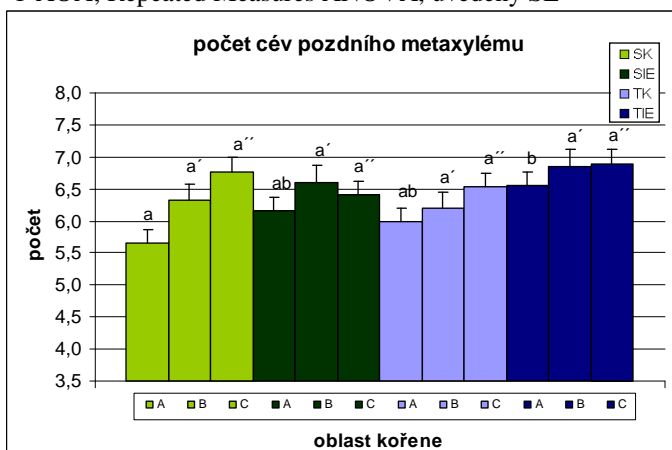
1-NAA OBLAST C		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	7,00	0,4366	a ns	0,0271	b $p < 0,01$
SA	6,75	0,4366	a ns	0,0271	b $p < 0,01$
TK	6,80	0,4366	a ns	0,0271	b $p < 0,01$
TA	6,40	0,4366	a ns	0,0271	a $p < 0,01$

významné snížení počtu cév v oblasti A a C působením auxinu ve stálé tmě, podobně jako tomu bylo u kultivace v kultivační místnosti (graf 4.38, tab. 4.29).

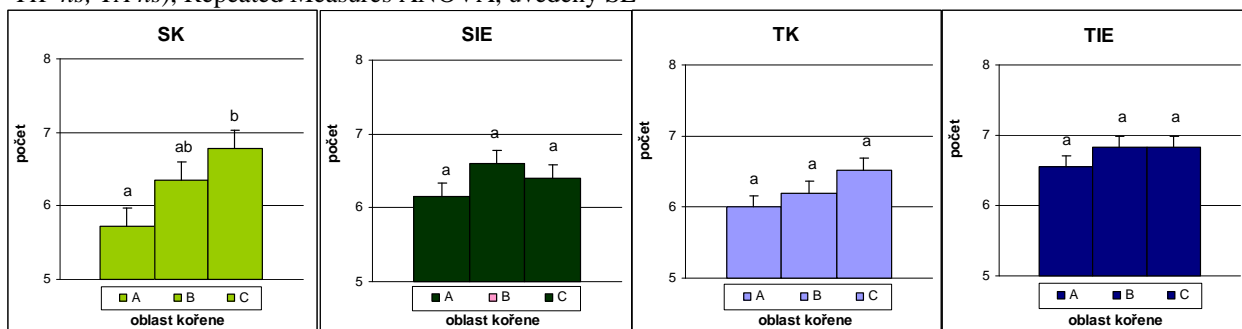
4.6.2. Vliv 1-AOA

Vliv koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ inhibitoru syntézy ethylenu na počet cév pozdního metaxylému byl sledován na rostlinách pěstovaných v kultivační místnosti. U kontrolních rostlin obou variant byla pozorována obdobná tendence nárůstu počtu cév od oblasti A až po oblast C, jako tomu bylo v předchozích kultivacích (kap.1.2.1). Sledované rozdíly mezi jednotlivými oblastmi podél kořene u všech variant s výjimkou SK nebyly statisticky potvrzeny (graf 4.41). Po působení inhibitoru došlo v oblastech A i B u obou sledovaných osvětlení ke statisticky významnému zvýšení počtu cév (graf 4.40, tab. 4.30).

Graf 4.40: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SIE, TIE použita koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.41: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK $p < 0,05$; SA ns; TK ns; TA ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Tab. 4.30: Počet cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SIE, TIE použita koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; kultivační místnost

1-AOA OBLAST A		Repeated Measures ANOVA			GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení		SE	statistické zhodnocení
SK	5,66	0,2156	a	$p < 0,05$	0,0832	a $p < 0,05$
SIE	6,15	0,2101	ab	$p < 0,05$	0,0832	b $p < 0,05$
TK	6,00	0,2101	ab	$p < 0,05$	0,0832	b $p < 0,05$
TIE	6,55	0,2101	b	$p < 0,05$	0,0832	c $p < 0,05$

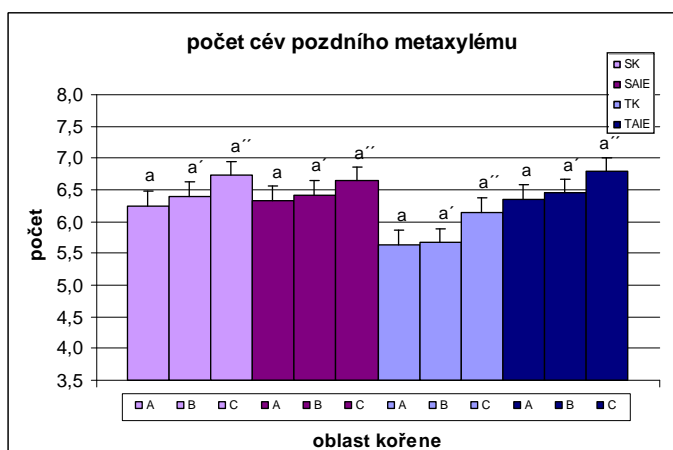
1-AOA OBLAST B		Repeated Measures ANOVA			GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení		SE	statistické zhodnocení
SK	6,32	0,2677	a	ns	0,0260	b $p < 0,01$
SIE	6,60	0,2609	a	ns	0,0260	c $p < 0,01$
TK	6,20	0,2609	a	ns	0,0260	a $p < 0,01$
TIE	6,85	0,2609	a	ns	0,0260	d $p < 0,01$

1-AOA OBLAST C		Repeated Measures ANOVA			GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení		SE	statistické zhodnocení
SK	6,78	0,2245	a	ns	0,0500	b $p < 0,05$
SIE	6,40	0,2245	a	ns	0,0500	a $p < 0,05$
TK	6,53	0,2245	a	ns	0,0500	b $p < 0,05$
TIE	6,88	0,2435	a	ns	0,0542	b $p < 0,05$

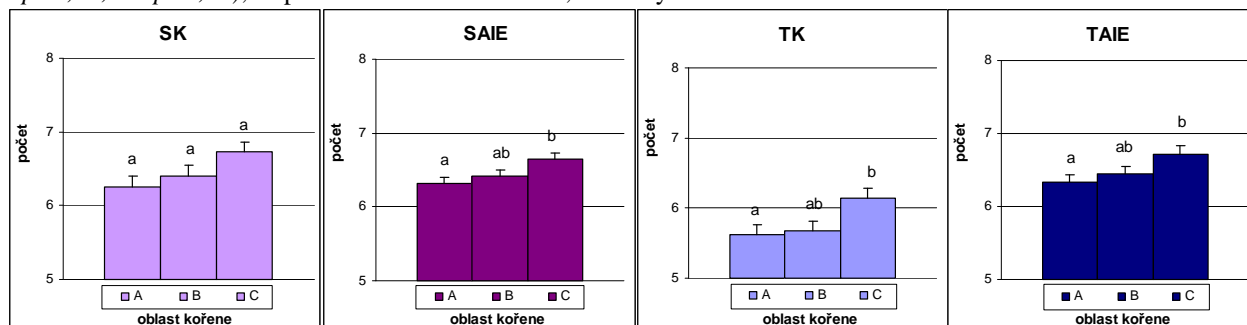
4.6.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA

Pro sledování společného působení auxinu s inhibitorem syntézy ethylenu na počet cév pozdního metaxylému byly rostliny kultivovány v klimaboxu. Chování kontrolních rostlin (SK i TK) bylo obdobné jako u předchozích kultivací, statisticky významné rozdíly byly nalezeny při testování s GLM ANOVA u oblastí A a C (**tab. 4.31**). Při sledování vlivu současného působení auxinu a inhibitoru ethylenu na oblasti podél osy kořene byly zjištěny za normálních světelných podmínek rozdíly mezi oblastmi A a C (**graf 4.43**). V porovnání s počtem cév u kontroly se však počet příliš nelišil. Naopak za stálé tmy došlo působením těchto látek k nárůstu počtu cév (**graf 4.42**).

Graf 4.42: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SAIE, TAIE použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.43: Porovnání počtu cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK ns; SA $p < 0,05$; TK $p < 0,05$; TA $p < 0,05$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Tab. 4.31: Počet cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SAIE, TAIE použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; klimabox

1-NAA + 1-AOA OBLAST A	Repeated Measures ANOVA			GLM ANOVA	
	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	6,25	0,2334	a ns	0,0406	b $p < 0,01$
SAIE	6,33	0,2334	a ns	0,0406	b $p < 0,01$
TK	5,63	0,2334	a ns	0,0406	a $p < 0,01$
TAIE	6,35	0,2334	a ns	0,0406	c $p < 0,01$

1-NAA + 1-AOA OBLAST B	Repeated Measures ANOVA			GLM ANOVA	
	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	6,40	0,2180	a $p < 0,05$	0,0791	b ns
SAIE	6,43	0,2180	a $p < 0,05$	0,0791	b ns
TK	5,68	0,2180	a $p < 0,05$	0,0791	a ns
TAIE	6,45	0,2180	a $p < 0,05$	0,0791	c ns

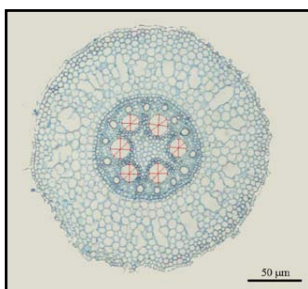
1-NAA + 1-AOA OBLAST C	Repeated Measures ANOVA			GLM ANOVA	
	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	6,73	0,2127	a ns	0,0497	b $p < 0,01$
SAIE	6,65	0,2127	a ns	0,0497	b $p < 0,01$
TK	6,15	0,2127	a ns	0,0497	a $p < 0,01$
TAIE	6,80	0,2127	a ns	0,0497	c $p < 0,01$

Shrnutí vlivu 1-NAA a/nebo 1-AOA na počet cév pozdního metaxylému:

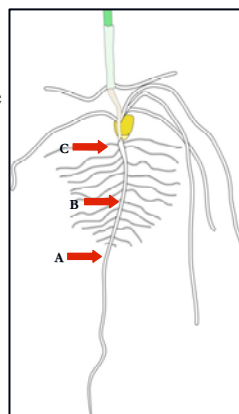
- Byl testován vliv auxinu ($5 \cdot 10^{-11} \text{M}$) a/nebo inhibitoru syntézy ethylenu ($200 \cdot 10^{-6} \text{M}$) na počet cév pozdního metaxylému ve třech vybraných oblastech hlavního kořene kukuřice kultivované v papíru.
- U kontrolních rostlin je patrná vzestupná tendence počtu cév od oblasti A do oblasti C
- Rozdíly mezi jednotlivými oblastmi podél osy kořene byly statisticky potvrzeny pouze u variant SAIE a TAIE
- Po aplikaci auxinu dochází většinou k mírnému poklesu počtu cév, statisticky potvrzenému zejména u rostlin ze stálé tmy. Přidaný 1-AOA způsobuje u obou použitých osvětlení naopak mírné zvýšení počtu cév, statisticky prokázanému u oblastí A a B. Kombinace těchto dvou látek způsobuje setření rozdílů mezi SK a SAIE. U rostlin ze stálé tmy dochází ve všech oblastech naopak ke zvýšení počtu cév.

4.7. Průměr cév pozdního metaxylému**4.7.1. Vliv 1-NAA**

Průměr cév pozdního metaxylému byl zjišťován obrazovou analýzou (**obr. 4.27**) na snímcích z trvalých preparátů pocházejících z tří různých oblastí hlavního kořene (**obr. 4.28**). Označení variant je shodné s označením použitým v předchozích kapitolách.



Obr. 4.27: Analýza průměru cév pozdního metaxylému v oblasti báze hlavního kořene

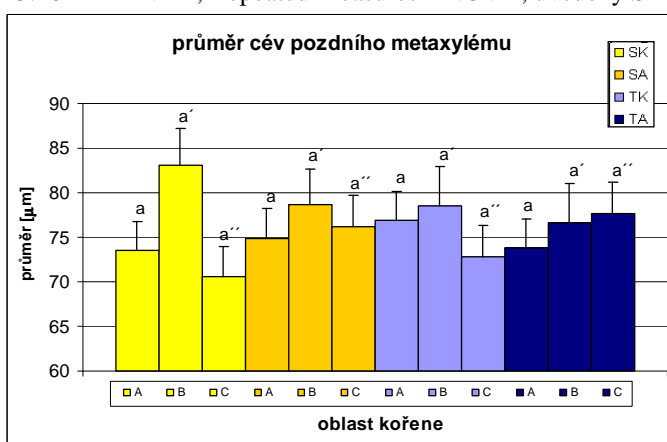


Obr. 4.28: Oblasti vybrané pro zjišťování průměru cév pozdního metaxylému u HK
A: polovina hlavního kořene,
B: třičtvrtina hlavního kořene,
C: báze hlavního kořene

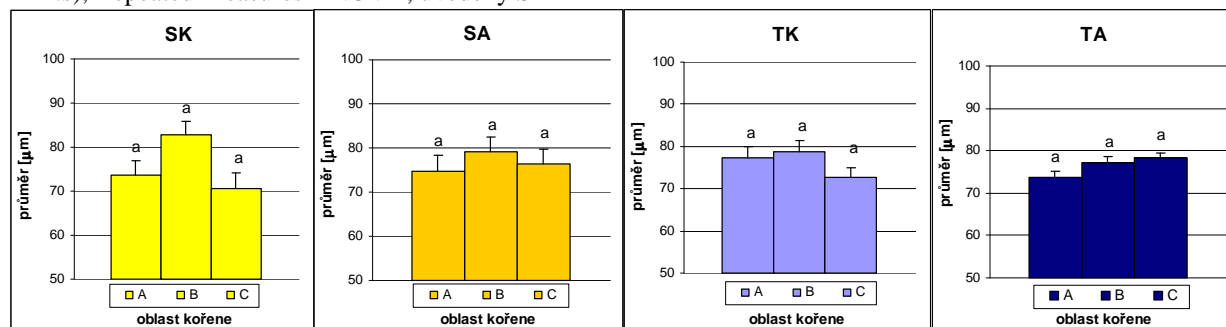
Při měření průměru cév pozdního metaxylému na hlavních kořenech rostlin pěstovaných v kutlivační místnosti byla zjištěna variabilita ve velikosti těchto cév. Kontrolní rostliny z normálního osvětlení a ze stálé tmy měly největší cévy v oblasti B, naopak nejmenší v oblasti C, tyto rozdíly mezi oblastmi však nebyly statisticky průkazné

(graf 4.45, tab. 4.32). Vystavením kořenů kontrolních rostlin stálé tmě došlo oproti SK v oblasti A ke zvýšení průměru cév, v oblasti C tomu bylo naopak. Při normálním osvětlení přidání auxinu způsobilo v oblasti A zvýšení, při stálé tmě snížení jejich velikosti, v oblasti B byl trend mezi kontrolami opačný. V oblasti C se při obou zkoušených osvětleních po působení auxinu zvýšila velikost cév (graf 4.44).

Graf 4.44: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.45: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK ns; SA ns; TK ns; TA ns), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Při měření průměru cév pozdního metaxylému u kořenů z rostlin pocházejících z klimaboxu byl trend mezi variantami obdobný (graf 4.47). Rozdíly byly nalezeny pouze u rostlin ze stálé tmy (TK i TA), kde byly zjištěny statisticky významné rozdíly podél kořene mezi oblastmi B a C (graf 4.46, tab. 4.33).

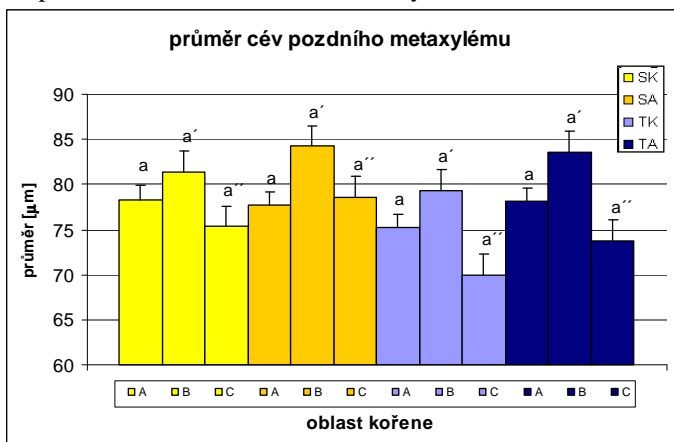
Tab. 4.32: Průměr cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA

1-NAA OBLAST A		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	73,49	3,3064	a ns	0,5266	a p<0,01
SA	74,89	3,3316	a ns	0,5306	b p<0,01
TK	76,89	3,2656	a ns	0,5201	c p<0,01
TA	73,80	3,3147	a ns	0,5279	ab p<0,01

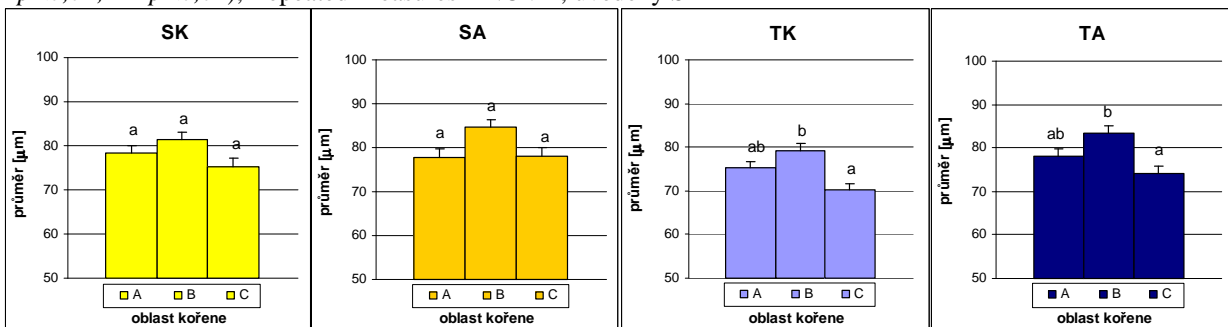
1-NAA OBLAST B		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	83,13	4,0304	a ns	0,5657	d p<0,01
SA	78,66	4,0304	a ns	0,5657	c p<0,01
TK	78,58	4,3087	a ns	0,6048	b p<0,01
TA	76,66	4,3087	a ns	0,6048	a p<0,01

1-NAA OBLAST C		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	70,54	3,40643	a ns	0,5058	a p<0,01
SA	76,21	3,48459	a ns	0,5174	c p<0,01
TK	72,77	3,5527	a ns	0,5275	b p<0,01
TA	77,61	3,5763	a ns	0,5310	d p<0,01

Graf 4.46: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.47: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK ns; SA ns; TK $p < 0,01$; TA $p < 0,01$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Tab. 4.33: Průměr cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SA, TA použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA

1-NAA OBLAST A		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	78,27	1,57641	a ns	0,53547	c $p < 0,01$
SA	77,66	1,5490	a ns	0,52615	b $p < 0,01$
TK	75,17	1,58598	a ns	0,53868	a $p < 0,01$
TA	78,09	1,57641	a ns	0,53547	bc $p < 0,01$

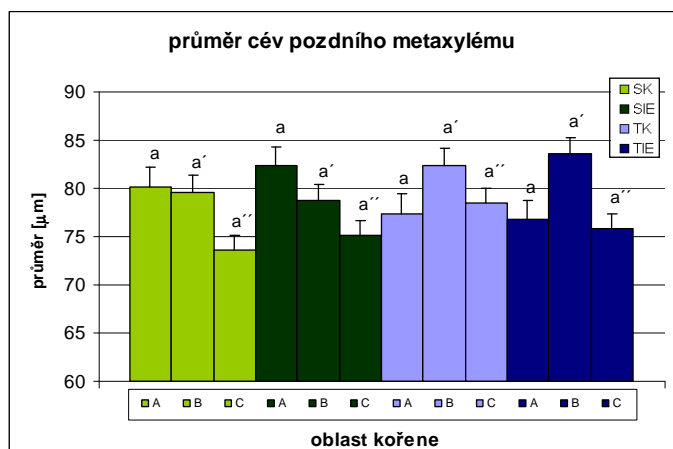
1-NAA OBLAST B		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	81,43	2,2238	a ns	0,56789	b ns
SA	84,24	2,24166	a ns	0,57245	d ns
TK	79,33	2,27872	a ns	0,58192	a ns
TA	83,58	2,33792	a ns	0,5970	c ns

1-NAA OBLAST C		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	75,32	2,30554	a ns	0,57886	c $p < 0,01$
SA	78,57	2,37438	a ns	0,59614	d $p < 0,01$
TK	69,93	2,3392	a ns	0,58731	a $p < 0,01$
TA	73,71	2,4112	a ns	0,60539	b $p < 0,01$

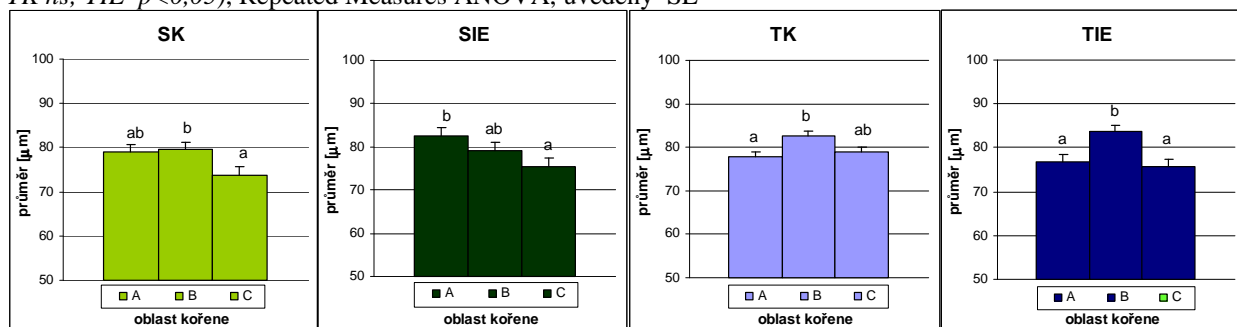
4.7.2. Vliv 1-AOA

Pro sledování vlivu inhibitoru syntézy ethylenu na průměr cév pozdního metaxylému pomocí obrazové analýzy ze snímků trvalých preparátů pocházejících ze tří různých oblastí hlavního kořene rostlin pěstovaných v kultivační místnosti byla použita koncentrace $200 \cdot 10^{-6}$ M 1-AOA. U kontrolních rostlin, zejména u varianty SK, se potvrdilo, že nejmenší velikost cév je v oblasti báze kořene. Inhibitor přidaný k rostlinám z normálního osvětlení způsobil oproti předchozím kultivacím změnu v poměru mezi jednotlivými oblastmi, největší cévy se tvořily v oblasti A, což bylo i statisticky potvrzeno (graf 4.48, 4.49, tab. 4.34).

Graf 4.48: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SIE, TIE použita koncentrace $200.10^{-6}M$ 1-AOA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.49: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK $p < 0,05$; SIE ns; TK ns; TIE $p < 0,05$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



4.7.3. Vliv 1-NAA + 1-AOA

Pro zjištění vlivu kombinace auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu na průměr cév pozdního metaxylému byly do kultivačního média rostlin pěstovaných v klimaboxu přidány koncentrace $5.10^{-11}M$ 1-NAA a $200.10^{-6}M$ 1-AOA. U kontrolních rostlin byly nejmenší cévy tvořeny podobně jako u předchozích kultivací v oblasti C, naopak statisticky průkazně největší cévy byly zjištěny v oblasti B. Při aplikaci auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu k rostlinám z obou typů osvětlení došlo ke změně poměru velikostí cév podél kořene. Největší cévy byly nalezeny v oblasti A, podobně jako tomu bylo u předchozí kultivace u varianty SIE. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými oblastmi podél kořene však byly zjištěny pouze u rostlin pěstovaných za stálé tmy (**graf 4.51**). Při porovnání vlivu současného působení těchto dvou látek na jednotlivé oblasti bylo zjištěno, že došlo téměř ve všech případech (vyjma TAIE, oblast A) ke statisticky významnému snížení průměru cév oproti příslušným kontrolám (**graf 4.50**, **tab. 4.35**).

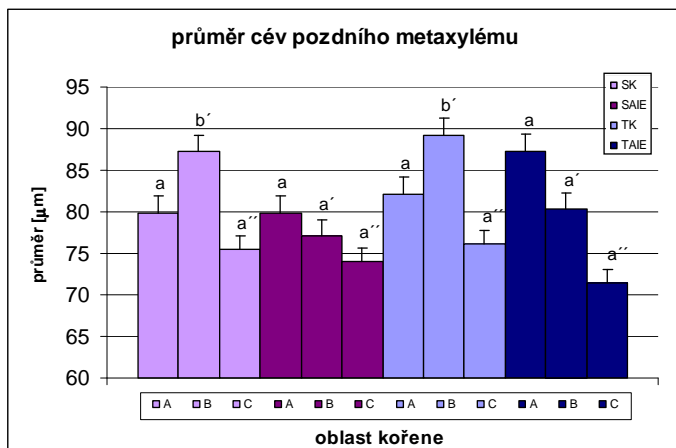
Tab. 4.34: Průměr cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SIE, TIE použita koncentrace $200.10^{-6}M$ 1-AOA

1-AOA OBLAST A		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	80,07	2,1038	a ns	0,4929	c $p < 0,01$
SIE	82,31	1,9794	a ns	0,4638	c $p < 0,01$
TK	77,41	2,0477	a ns	0,4798	b $p < 0,01$
TIE	76,78	1,9555	a ns	0,4582	a $p < 0,01$

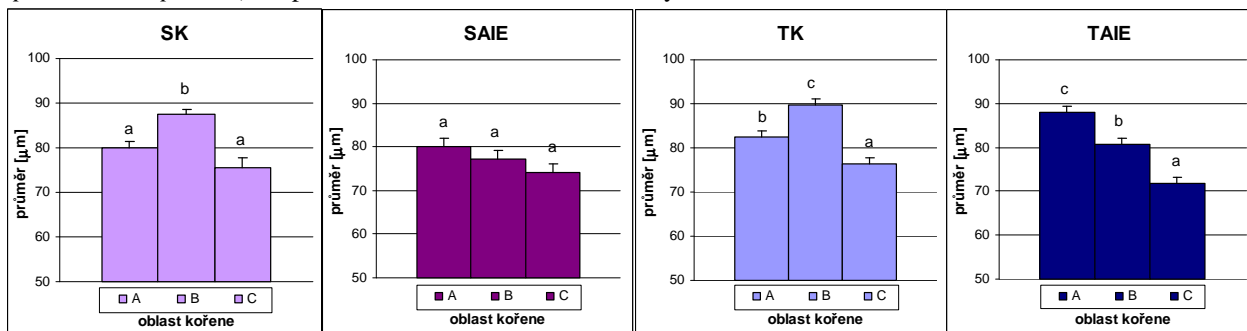
1-AOA OBLAST B		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	79,56	1,7737	a ns	0,4985	b $p < 0,01$
SIE	78,71	1,6770	a ns	0,4713	a $p < 0,01$
TK	82,37	1,7372	a ns	0,4882	c $p < 0,01$
TIE	83,61	1,6582	a ns	0,4660	d $p < 0,01$

1-AOA OBLAST C		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	73,60	1,4877	a ns	0,4338	a $p < 0,01$
SIE	75,16	1,5278	a ns	0,4455	b $p < 0,01$
TK	78,45	1,5338	a ns	0,4473	d $p < 0,01$
TIE	75,80	1,6049	a ns	0,4680	c $p < 0,01$

Graf 4.50: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami; u SAIE, TAIE použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA; Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Graf 4.51: Porovnání průměru cév pozdního metaxylému jednotlivých oblastí dané varianty (pro SK $p < 0,01$; SIE ns; TK $p < 0,01$; TIE $p < 0,01$), Repeated Measures ANOVA, uvedeny SE



Tab. 4.35: Průměr cév pozdního metaxylému u různých variant v různých oblastech hlavního kořene; u SAIE, TAIE použita koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA a $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA

1-NAA + 1-AOA OBLAST A		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	79,89	2,0477	a p<0,05	0,4282	b p<0,01
SAIE	79,86	2,0066	a p<0,05	0,4196	a p<0,01
TK	82,03	2,1947	a p<0,05	0,4589	c p<0,01
TAIE	87,28	2,0310	a p<0,05	0,4282	d p<0,01

1-NAA + 1-AOA OBLAST B		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	87,26	1,9396	b p<0,01	0,4434	b p<0,01
SAIE	77,03	1,9396	a p<0,01	0,4434	a p<0,01
TK	89,14	2,0923	b p<0,01	0,4783	c p<0,01
TAIE	80,38	1,9321	a p<0,01	0,4416	a p<0,01

1-NAA + 1-AOA OBLAST C		Repeated Measures ANOVA		GLM ANOVA	
varianta	průměr	SE	statistické zhodnocení	SE	statistické zhodnocení
SK	75,49	1,5585	a ns	0,4003	b p<0,01
SAIE	74,11	1,5703	a ns	0,4034	ab p<0,01
TK	76,13	1,6339	a ns	0,4197	c p<0,01
TAIE	71,49	1,5526	a ns	0,3988	a p<0,01

Shrnutí vlivu 1-NAA a/nebo 1-AOA na průměr cév pozdního metaxylému:

- Byl testován vliv auxinu ($5 \cdot 10^{-11} \text{M}$) a/nebo inhibitoru syntézy ethyleny ($200 \cdot 10^{-6} \text{M}$) na průměr cév pozdního metaxylému ve třech vybraných oblastech hlavního kořene kukuřice kultivované v papíru.
- U většiny případů byly pozorovány statisticky významné rozdíly jak mezi oblastmi podél osy kořene, tak mezi jednotlivými variantami.
- U kontrolních rostlin u obou typů osvětlení jsou největší cévy tvořeny v oblasti B, nejmenší pak v oblasti C.
- Aplikace 1-NAA nevykazuje vliv na poměr průměru cév v jednotlivých oblastech dané varianty. Vliv auxinu při obou typech osvětlení v různých kultivačních místech byl různý. Přidání 1-AOA způsobuje za fotoperiody 16/8 změnu v poměru průměru cév mezi oblastmi, k tvorbě největších cév dochází v oblasti A. Současná aplikace 1-NAA + 1-AOA způsobuje změnu poměru velikostí cév mezi oblastmi ve prospěch oblasti A, a to u obou použitých osvětlení.

5. DISKUZE

Kukuřice (*Zea mays*) patří mezi modelové organizmy pro studium hypoxických podmínek. Je o nich známo, že stimulují vytváření lyzigenního aerenchymu, v jehož tvorbě hraje významnou úlohu ethylen. Biosyntéza tohoto fytohormonu je ovlivnitelná mnoha činiteli, jako například auxinem a světelnými podmínkami. Jak bylo v této práci ukázáno, při výzkumu aerenchymu a dalších charakteristik hraje důležitou úlohu typ kultivace a podmínky, za kterých kultivace probíhá.

5.1. Kultivační postupy

Byly použity dva kultivační postupy - vodní kultury a kultivace v papíru. Vodní kultury mají pro experimentální práci řadu výhod. Pro příklad uveďme nízký mechanický odpor při růstu kořenů, dostupnost živin podél celého kořene nebo dobrou manipulovatelnost s napěstovaným materiálem. Mezi nevýhody tohoto typu kultivace patří riziko významného poklesu hladiny kyslíku kolem kořenů, neboť difúze plynů ve vodním prostředí je až 10 000 krát nižší než na vzduchu (difúze $O_{2ve\ vzduchu} = 0,206\text{cm}^2\text{s}^{-1}$; $O_{2ve\ vodě} = 0,180 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$), (Kossaczký & Surový, 1972). Z tohoto důvodu je nutné kultivační roztok provzdušňovat, avšak mnohdy je těžké stanovit vhodnou míru vhánění kyslíku, která by zajistila dostatečné zásobení rostliny tímto plynem a zároveň aby nedocházelo k mechanickému stresu a tím i ovlivnění sledovaných jevů. Na počátku série pokusů s vodními kulturami byl proveden experiment, který ověřil poznatky získané již v dřívějších pracích o působení provzdušňovaného a stagnantního média na růst rostlin (Hlavatá, 1992; Lenochová, 2004). Výsledky předchozích prací byly potvrzeny, a proto bylo možné na ně navázat. Hypoxický stres se projevil zejména zpomalením růstu listů a hlavního kořene (kap. 8). Poté byla provedena pokusná kultivace se zavzdušňováním roztoku, kde byla sledována míra vhánění vzduchu ke kořenům a optimalizován postup. Všechny hydroponické kultivace byly po celou dobu trvání pokusu provzdušňovány z důvodu citlivosti rostlin kukuřice (*Zea mays*) na dostupnost kyslíku v prostředí. Pro zajištění stálých podmínek, a tudíž k vyloučení možného působení dalšího nežádoucího faktoru, bylo po celou dobu kultivace sledováno a udržováno pH na hodnotách kolem 5,5, což je hodnota, při které kukuřice (*Z. mays*) prospívá nejlépe (Stehlíková, 2005).

Druhým typem kultivace, kterým byly rostliny pěstovány, je tzv. kultivace v papíru, jejíž princip je popsán v kap. 3.2.2.2. Tento méně známý typ kultivace byl vybrán pro dosažení maximálního možného přístupu kyslíku ke kořenům. Toho lze dosáhnout i jiným typem kultivací, jako například aeroponií, kdy jsou kořeny rostlin vystaveny vzduchu s nasycenými vodními parami, avšak na rozdíl od této kultivace zajišťuje sterilizovaný filtrační papír, kterým kořeny prorůstají, lepší simulaci mechanického odporu substrátu v přirozených podmínkách. Navíc oproti aeroponické kultivaci, kde jsou konce kořenů namočené do kultivačního roztoku, a tudíž jsou tyto oblasti vystaveny nižší dostupnosti kyslíku (Enstone & Peterson, 1998), umožňuje kultivace v papíru vztlínání roztoku papírem ke všem částem kořenů a navíc zajišťuje rovnoměrnou distribuci kyslíku. Její nevýhodou je poměrně obtížné odstraňování filtračního papíru, který ulpívá na kořenech rostlin, což bylo nemalou překážkou zejména při zjišťování hmotnosti hlavních kořenů. Při posuzování výsledků je tedy nutné mít na paměti, že hodnoty získané při vážení takového materiálu mohou být do určité míry zkreslené - jednak mohou ukazovat vyšší hodnoty díky zbytkům papíru na kořenech, na druhou stranu skutečná hmotnost může být snížena poškozením jemných postranních kořenů při jejich vyprošťování z papíru. Hodnota pH kultivačního média byla při tomto způsobu kultivace nastavena pouze na počátku pokusu a oproti hydroponii nebyla dále sledována.

5.2. Vliv fytohormonů na růstové charakteristiky rostlin

5.2.1. Účinky auxinu v závislosti na jeho množství

Auxin, jeden ze zástupců fytohormonů, vyvolává řadu různých procesů při růstu rostlin. V závislosti na množství a místě působení v rostlině může působit stimulačně, nebo může vyvolávat negativní účinky na růst jednotlivých orgánů. Pro experimentální účely se dnes čím dál méně používá přírodní auxin IAA, s výjimkou krátkodobých pokusů, neboť může docházet k jeho rozkladu, což pak ovlivňuje konečnou efektivní koncentraci (Zažímalová, *ústní sdělení*). Pro dlouhodobé experimenty se používá řada syntetických analogů přírodního auxinu, jako například 1-NAA, která byla použita i v této práci.

V současnosti existuje celá řada prací, které uvádějí u různých rostlinných materiálů konkrétní hodnoty koncentrací, ať již pozitivně či negativně působících na rostliny, nicméně mnohdy lze nalézt velice rozdílné hodnoty koncentrací u stejného materiálu, které však vyvolávají podobné odpovědi. Rozdíly v účinnosti různých

koncentrací auxinu závisí jednak na druhu rostliny, stáří pletiva nebo typu použitého auxinu. Účinnost jednotlivých typů auxinu je však do velké míry ovlivněna také kultivačními podmínkami, jako například osvětlením, složením kultivačního roztoku, teplotou či hodnotou pH, avšak záznamy o těchto podmínkách jsou v mnoha pracích dosti strohé.

Vysoké koncentrace auxinu působí inhibici růstu nadzemních i podzemních orgánů, avšak konkrétní hodnoty i u téhož orgánu se liší, což dokládají pozorování huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), u kterého snížený růst kořenů způsobil přírodní auxin IAA i syntetický analog auxinu 2,4-D v koncentraci 10^{-6} M (Pickett *et al.*, 1990), avšak při použití jiného syntetického analogu auxinu, 1-NAA, bylo snížení patrné při koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M (Růžička *et al.*, 2007). Snížení celkového vzrůstu kukuřice (*Zea mays*), svinutí listů a redukci hmotnosti hlavních i adventivních kořenů způsobilily koncentrace $3 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-6}$ M 1-NAA (Stehlíková, 2005), při použití přírodního auxinu jsou však zapotřebí vyšší koncentrace, $1 \cdot 10^{-5}$ M IAA (Votrubová & Votruba, 1986). Moje práce ukazuje, že koncentrace působící negativně na růst orgánů kukuřice (*Z. mays*) byly ve skutečnosti několikrát nižší, konkrétně $1 \cdot 10^{-8}$ M, $1 \cdot 10^{-9}$ M, $5 \cdot 10^{-10}$ M i $1 \cdot 10^{-10}$ M 1-NAA. Síla negativního účinku exogenně aplikovaného auxinu byla úměrná použité koncentraci. Působení jednotlivých koncentrací je závislé na světelných podmínkách. Výše zmíněné koncentrace vykazovaly výraznější rozdíly v účinku při pěstování rostlin za fotoperiody 16/8, kdy došlo k významnému snížení délky listů, na jejichž čepelích se při vyšších koncentracích objevovaly různě rozsáhlé léze, lokální chlorózy a oschlé okraje. Negativně byla ovlivněna i délka a čerstvá hmotnost hlavních kořenů a počet a celková délka postranních kořenů tvořících se na hlavních kořenech. Při koncentracích vyšších než $1 \cdot 10^{-9}$ M 1-NAA bylo možné u některých rostlin pozorovat na různých místech hlavních kořenů ztlustliny, což bylo v souladu i s jinými pracemi (Stehlíková, 2005), tyto struktury však nebyly dále zkoumány. Hlavní kořeny při koncentracích vyšších než $1 \cdot 10^{-8}$ M 1-NAA vykazovaly změny v gravitropním růstu (Stehlíková, 2005), avšak u nižších, mnou testovaných koncentrací, nebyly zaznamenány. Kořenový systém kukuřice (*Z. mays*) tvoří vedle hlavních kořenů též adventivní kořeny vyrůstající z různých míst rostliny. Vysoké koncentrace auxinu zvýšily počet adventivních kořenů vyrůstajících z mezokotylu (Stehlíková, 2005), avšak rozdíly mezi jednotlivými variantami v mých experimentech nebyly patrné. Redukce v počtu adventivních kořenů byla pozorována také při aplikaci vysokých koncentrací přírodního auxinu IBA ke stonkovým segmentům petúnie (*Petunia x hybrida*) a rajčete (*Lycopersicon esculentum*), (Clark *et al.*, 1999). Při snižující

se koncentrací auxinu jsem pozorovala zvýšení poměru mezi délkou hlavních kořenů a adventivních seminálních kořenů, detailně však tento typ kořenů nebyl zkoumán.

Cílem dílčích pokusů sledujících účinek jednotlivých koncentrací 1-NAA bylo určení koncentrace stimulující růst rostlin kukuřice (*Z. mays*). U huseníčku (*A. thaliana*) jde o množství nižší než 1.10^{-6} M IAA či 2,4-D (Pickett *et al.*, 1990). U kukuřice (*Z. mays*) tuto koncentraci představuje 1.10^{-8} M IAA (Votrubová & Votruba, 1986), avšak při použití syntetického analogu se ukázala být hledanou hodnotou až 5.10^{-11} M 1-NAA, tedy o pět řádů nižší než nejvyšší předpokládaná a zkoušená koncentrace u této rostliny. Tyto příklady z huseníčku (*A. thaliana*) a kukuřice (*Z. mays*) naznačují, že vedle kultivačních podmínek, které nepochybně hrají velice důležitou roli v odlišných efektivních koncentracích různých typů auxinů, je patrně i důležité, zdali jde o rostlinu jednoděložnou či rostlinu dvouděložnou.

Exogenně dodaný auxin v koncentraci 5.10^{-11} M za obou zkoušených osvětlení stimuloval u kukuřice prodlužování listů a nárůst jejich čerstvé i suché hmotnosti. U podzemních částí rostliny vykazoval (výrazněji u rostlin pěstovaných za normálního osvětlení) též kladný vliv na délku a čerstvou hmotnost hlavních kořenů. U kukuřice (*Z. mays*) tato koncentrace průkazně stimulovala jak počet prorostlých postranních kořenů z hlavního kořene, tak i jejich následné prodlužování. U kořenových segmentů ředkvičky (*Raphanus sativus*) bylo pozorováno, že exogenně dodaný auxin, v koncentracích 1.10^{-6} M, 3.10^{-6} M, 1.10^{-5} M a 3.10^{-5} M IAA, zvyšoval počet založených primordií, avšak jejich prorůstání z hlavního kořene bylo inhibováno (Kerk *et al.*, 2000). Rozdílný vliv auxinu na tyto dva procesy vývoje postranních kořenů je dán odlišným řízením těchto procesů. Již v počátku vzniku postranního kořene při založení tzv. zakladatelských buněk, tedy vlastních buněk pericyklu dávajících vznik základu (primordiu) postranního kořene, je auxin, přivedený transportem probíhajícím v kořeni bazipetálně, velice důležitým aktérem (Casimiro *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002a). Při exogenní aplikaci tohoto fytohormonu v koncentraci 9.10^{-5} M IAA, 1.10^{-6} M 1-NAA u ředkvičky (*R. sativus*) nebo 3.10^{-5} M IAA u huseníčku (*A. thaliana*) dochází již po několika hodinách k dělení většího množství buněk pericyklu ležících na xylémovém pólu, čímž se zvyšuje množství založených primordií (Laskowski *et al.*, 1995; Blakely *et al.*, 1982). Prostřednictvím přesměrovávání polárního auxinového transportu zprostředkovaném PIN proteiny ovlivňuje tento fytohormon i další vývoj primordií a posléze postranních kořenů (tj. těch, jež prorostly rodičovským kořenem), (Benková *et al.*, 2003). Pro růst postranních kořenů je však

důležitý akropetální směr auxinového transportu v kořeni (Casimiro *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002a).

Koncentrace $5 \cdot 10^{-10} \text{M}$ i $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA aplikované k rostlinám kukuřice (*Z. mays*) pěstovaným papírovou kultivací vykazovaly podobný trend jako při pěstování v hydroponii. Sedmidenní rostliny při koncentraci $5 \cdot 10^{-10} \text{M}$ vytvářely kratší listy a jejich hmotnost sušiny byla nižší. Prodlužování hlavních kořenů bylo také inhibováno. Naopak koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA způsobovala statisticky významné prodloužení listů, zvýšení jejich suché hmotnosti a též délky hlavních kořenů. Tyto rozdíly, podobně jako u kultivace rostlin v hydroponii, byly výraznější při aplikaci fotoperiody 16/8, při které docházelo u všech variant k zabarvení kořenového systému do červena. Toto zabarvení bylo pravděpodobně způsobeno ukládáním antokyanů vlivem dopadajícího světla, jehož průniku nebylo fyzicky možné zcela zabránit. Červenání kořenů vlivem antokyanů bylo pozorováno u mnoha dalších druhů rostlin, jako například u železnece (*Metrosideros excelsa*). Nejdůležitější funkcí těchto flavonoidů je ochrana před nadměrným slunečním ozářením (Solangaarachchi & Gould, 2001).

Výše popsané kultivace s 1-NAA probíhaly v kultivační místnosti. Pro technické potíže s kultivační místností bylo u některých kultivací nutné využít kultivačních boxů. Na zachování stejných parametrů (konkrétní hodnoty a jednotlivé parametry v kap. 3.2.2.2.) byl kladen veliký důraz, avšak technicky nebylo možné dosáhnout stejné intenzity osvětlení, která byla 2,5 krát nižší než v kultivační místnosti. To se zásadně projevilo na výsledcích, které byly odlišné od dat získaných z rostlin pěstovaných v kultivační místnosti. V kultivačním boxu byla zkoušena koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA, avšak oproti výsledkům z papírové kultivace konané v kultivační místnosti nevykazovaly výsledky oproti kontrolám žádné statisticky významné ovlivnění růstovým regulátorem. Kultivační místa se však musela lišit i jinými parametry, neboť rostliny pěstované s koncentrací $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA v klimatickém boxu za stálé tmy také nevykazovaly žádné rozdíly od příslušných kontrolních rostlin a těmto rostlinám červenaly okraje listových čepelí. Jedním z dalších možných parametrů, který mohl zapříčinit rozdílné výsledky, je vlhkost vzduchu, která nemohla být v klimaboxu z technických důvodů nastavená na totožnou hodnotu. Tato dvě místa se výrazně odlišovala také cirkulací vzduchu. Oproti kultivační místnosti, kde je klimatizací zajištěna výměna vzduchu s několika hodinovými intervaly, je v klimaboxu tato výměna nepatrná, což mohlo ovlivnit hromadění ethylenu v klimaboxu a následně i chování rostlin (viz dále, kap. 5.2.2.). Odlišné výsledky získané

ze dvou různých kultivačních míst poukazují na důležitost dodržení stejných parametrů při opakování jednotlivých experimentů s rostlinným materiálem.

5.2.2. Vliv ethylenu, inhibice jeho syntézy

Ethylen, jediný plynný fytohormon, je spojen s mnoha procesy probíhajícími v rostlině (Štěpánová & Alonso, 2005). V závislosti na načasování ošetření, na fyziologických podmínkách, věku a druhu rostliny ethylen pozitivně či negativně ovlivňuje různé procesy v životě rostlin. Jeho hladina se zvyšuje také při působení různých stresů.

Ethylen stimuluje dlouhivý růst hypokotylu huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) rostoucího na světle (Smalle *et al.*, 1997). Inhibice jeho syntézy prostřednictvím $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA, inhibitoru syntézy ethylenu působícího negativně na enzym ACC syntázu, způsobilo při sedmidenní papírové kultivaci kukuřice (*Zea mays*) při fotoperiodě 16/8 v kultivační místnosti výraznou inhibici růstu listů a jejich čerstvé hmotnosti. Tentýž inhibitor aplikovaný v polovičním množství nevykazoval statisticky významné rozdíly v charakteristikách prýtu oproti kontrolním rostlinám, podobně jako při aplikaci 10^{-5}M AVG u prýtu svízele (*Galium aparine*), (Hansen & Grossmann, 2000). U hlavních kořenů kukuřice (*Z. mays*) zapříčinila vyšší sledovaná koncentrace snížení délky o polovinu a výrazná byla i inhibice hmotnosti sušiny. Takto vypěstované rostliny se vyznačovaly specifickou distribucí postranních kořenů podél osy hlavního kořene, které se utvářely pouze u jejich báze a jevíly se zesílené. Koncentrace $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$ způsobila za fotoperiody 16/8 slabší, avšak statisticky průkaznou, redukci délky HK.

Při kultivaci rostlin za stálé tmy působí ethylen zkrácení hypokotylu a HK huseníčku (*A. thaliana*), (Guzmán & Ecker, 1990; Štěpánová *et al.*, 2005). Při pěstování kukuřice (*Z. mays*) kultivací v papíru způsobila 1-AOA v koncentraci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ snížení délky a čerstvé hmotnosti listů, v koncentraci $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$ nebyly objeveny průkazné rozdíly od kontroly. Při vyšší sledované koncentraci došlo k významnému zkrácení HK a snížení jejich hmotnosti sušiny, při poloviční k méně výraznému, avšak taktéž průkaznému snížení. Výraznější změny byly tedy pozorovány v nadzemních částech rostlin za normálního osvětlení oproti rostlinám pěstovaným ve stálé tmě. Lenochová, (submitted), sledovala vliv téhož inhibitoru na délku listů a HK u stejně starých rostlin kukuřice (*Z. mays*). Při aplikaci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA pozorovala obdobný trend v inhibici

nadzemních i podzemních orgánů, avšak vyšší rozdíly se v jejích experimentech ukázaly u rostlin pěstovaných za stálé tmy. Dále zkoušela vliv koncentrace $900 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA, která byla pro kukuřici (*Z. mays*) za světla příliš vysoká a způsobovala odumření celých rostlin. Nicméně je zajímavé, že pro rostliny pěstované za stálé tmy nebyla takto vysoká koncentrace letální a rostliny tvořily HK dlouhé jako při působení $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA.

Souhrn sledování vlivu jednotlivých koncentrací 1-AOA umožňuje alespoň částečně odhadnout sílu účinku inhibitoru na syntézu ethylenu. Pokud by koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA způsobila absolutní inhibici syntézy ethylenu, mělo by podle očekávání dojít ke stimulaci růstu rostliny. Reakce rostlin však byla opačná. Mohlo však dojít pouze k částečné inhibici syntézy ethylenu, a tedy pouze k určitému snížení růstu. Při aplikaci nižšího množství inhibitoru by tak měl být účinek na inhibici syntézy ethylenu nižší a vznikající ethylen by inhiboval růst více než koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA. Ve skutečnosti tomu bylo naopak, proto se domnívám, že použitá koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA kromě inhibice syntézy ethylenu měla na rostlinu toxické účinky. To potvrzuje i působení koncentrace $900 \cdot 10^{-6} \text{M}$, která byla dokonce neslučitelná se životem rostliny (Lenochová, submitted).

Vysvětlení pozorovaných rozdílů týkajících se síly působení 1-AOA za fotoperiody 16/8 a stálé tmy lze nalézt v odlišném vlivu světelných podmínek při vytváření ethylenu. U huseníčku (*A. thaliana*), (Thain *et al.*, 2004), čiroku (*Sorghum bicolor*), (Finlayson *et al.*, 2004; Finlayson *et al.*, 1998), či merlíku (*Chenopodium rubrum*), (Macháčková *et al.*, 1997) bylo zjištěno, že produkce ethylenu je regulována světlem řízenými denními hodinami, které ovlivňují převážně expresi genů ACC syntázy. Oproti merlíku (*Ch. rubrum*), kde byl zaznamenán úbytek tvorby ethylenu ve tmě, u jednoděložného čiroku (*S. bicolor*) bylo zjištěno, že uvolňování ethylenu vykazuje několik maximálních hodnot během 24 hodin, a že při zastínění se zvyšuje amplituda těchto rytmů (Finlayson *et al.*, 1998; Vandebussche *et al.*, 2003). Pozorovaná fotoperiodicky regulovaná produkce u relativně blízce příbuzného druhu ukazuje na možnost vlivu různých zkoušených osvětlení, což by vysvětlovalo pozorované rozdíly v účinku 1-AOA. Pokud by se potvrdilo, že zvýšení amplitudy těchto rytmů při nedostatku světla způsobuje tvorbu vyššího množství ethylenu u jednoděložné kukuřice (*Z. mays*) znamenalo by to potvrzení mých pozorování, že ethylen snižuje negativní účinek 1-AOA ve tmě, a proto byla pozorována nižší inhibice u takto pěstovaných rostlin. Potvrzení této skutečnosti by i podpořilo mé výsledky při řešení rozporu se závěry v práci Lenochová, (submitted), která pozorovala na rozdíl od mých výsledků vyšší inhibici růstu rostlinných orgánů s 1-AOA

ve stálé tmě. Důvodem odlišných výsledků by mohlo být i místo kultivace rostlinného materiálu. Na rozdíl od Lenochové, (submitted), která pěstovala rostliny v kultivační místnosti či ve skleníku, byly v mé práci rostliny pěstovány v klimaboxu, ve kterém, jak již bylo řečeno v předchozí kapitole 5.2.1., se mohla projevit nedostatečná cirkulace vzduchu. To mohlo zapříčinit vyšší akumulaci ethylenu produkovaného rostlinami v blízkém okolí rostlin a následné snížení negativního účinku 1-AOA, zejména u rostlin pěstovaných za stálé tmy.

Zvýšená tvorba ethylenu se objevuje při působení různých druhů stresu. Při prorůstání kořenů rajčete (*Lycopersicon esculentum*) utuženou půdou zajišťuje ethylen jejich normální růst, neboť bylo zjištěno, že kořeny mutantů necitlivých na ethylen rostly v mechanicky odolnější půdě hůře než kořeny kontrolních rostlin (Clark *et al.*, 1999). Omezení syntézy ethylenu působením vyšších dávek inhibitoru by mohlo zvýšit citlivost kořenů na mechanický stres a způsobit snížení jejich růstu. Bylo by zajímavé porovnat růstové charakteristiky kořenů rostlin pěstovaných různými typy kultivací, jako hydroponickou kultivací, zajišťující minimální odpor, a například kultivací v písku, více simulující přirozený substrát.

Po aplikaci inhibitoru ethylenu 1-AOA k hydroponicky pěstovaným rostlinám kukuřice (*Z. mays*) docházelo po několika dnech k jejich odumírání, počínaje od kořenů. U hydroponických kultivací se nelze vyhnout částečnému nedostatku kyslíku v médiu, což zřejmě s účinkem vyšších koncentrací inhibitoru a zablokováním syntézy stresového hormonu ethylenu, který zajišťuje tvorbu různých obranných mechanismů k vyhnutí se nepříznivým účinkům hypoxie, způsobilo pozorované odumírání rostlin.

5.2.3. Složitý vztah mezi auxinem a ethylenem

Do dnešní doby bylo popsáno mnoho procesů, ve kterých hrají auxin nebo ethylen významnou roli a u nichž se působení těchto dvou fytohormonů na mnoha úrovních různě překrývá či vzájemně doplňuje. Na molekulární úrovni auxin stimuluje enzym ACC syntázu, který umožňuje vznik přímého prekurzoru ethylenu, ACC. Po zvýšení hladiny auxinu dochází ke stimulaci hladiny ethylenu, který pak zapříčiní zpomalení prodlužování internodií, redukci listové plochy a vznik epinastie u svícele (*Galium aparine*), (Hansen & Grossmann, 2000). Negativní vlivy auxinu na růst jednotlivých částí rostlin jsou tedy alespoň z části, zprostředkované působením ethylenu. Konečný účinek však zřejmě závisí na množství aplikovaných látek, což dokládají následující příklady. Při aplikaci samotné

IAA či 1-NAA v koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ došlo k inhibici růstu prýtu svícele (*G. aparine*). V kombinaci s AVG v koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ byl růst prýtu ovlivněn také negativně (Hansen & Grossmann, 2000). Totéž pozorovali i Ponce *et al.*, (2005) na kořenech kukuřice (*Zea mays*). Collett *et al.*, (2000) pozorovali, že IAA v koncentracích $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$, $2 \cdot 10^{-8} \text{M}$, $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$, $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ a $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ inhibuje růst hypokotylu huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), avšak při současném zablokování syntézy ethylenu pomocí AVG v koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ téměř nedošlo ke změně účinku auxinu. Na druhou stranu při současné aplikaci auxinu v množství stimulujičím růst hypokotylu huseníčku (*A. thaliana*) za normálních světelných podmínek a AVG v koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{M}$ došlo ke zdvojnásobení délky hypokotylu oproti kontrolním rostlinám pěstovaných bez růstových regulátorů (Smalle *et al.*, 1997). Nicméně i ethylen působí alespoň částečně samostatně, což dokládá sledování mutantů *aux1*, ve kterých po exogenním dodání ethylenu došlo k určitému omezení růstu kořenů huseníčku (*A. thaliana*), (Swarup *et al.*, 2007; Collett *et al.*, 2000).

Při aplikaci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA spolu s $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA k rostlinám kukuřice (*Z. mays*) pěstovaným v klimaboxu došlo za fotoperiody 16/8 k podobnému avšak mnohem nápadnějšímu účinku než při aplikaci samotného 1-AOA. Konkrétně došlo k výraznému zkrácení a svinutí listů při zachování jejich suché hmotnosti a ke snížení délky a hmotnosti sušiny hlavních kořenů o více než 50%. Ve stálé tmě byla reakce listů etiolovaných rostlin opačná. Zejména hmotnost jejich sušiny byla průkazně zvýšená při působení kombinace těchto látek, podobně jako u ošetření 1-NAA v papírové kultivaci za stálé tmy. Dokonce po současné aplikaci těchto látek bylo možné pozorovat vznik červeného lemování okraje listů, jako u samotného 1-NAA. Tyto změny však nebyly dále sledovány. Hlavní kořeny za těchto světelných podmínek byly méně inhibované než za světla, podobně jako u ošetření samotným 1-AOA, což lze vysvětlit indukcí produkce ethylenu prostřednictvím cirkadiální rytmicity, která následně působila proti účinku inhibitoru.

5.3. Tvorba aerenchymu u kukuřice je ovlivnitelná mnoha faktory

Jednou z anatomických adaptací na hypoxické podmínky je vytváření aerenchymu, parenchymatického pletiva s velkými mezibuněčnými prostory v primární kůře, jenž rostlině slouží jako provzdušňovací systém. Jeho tvorba je druhově specifická. U kukuřice (*Zea mays*) byl popsán tzv. lyzigenní typ aerenchymu, který, oproti mokřadním rostlinám

vytvářejícím toto pletivo konstitutivně, vyžaduje ke svému vzniku určitý vnější podnět, jako například zmiňovaný nedostatek kyslíku v rhizosféře.

Při pěstování kukuřice (*Z. mays*) v provzdušňovaných hydroponických kultivacích se však ukázalo, že rostliny kontrolních variant vytvářely v hlavních kořenech určité množství aerenchymu. Nešlo však o ojedinělý případ. Aerenchym u kontrolních rostlin byl nalezen u hlavních (Lenochová, submitted), (Hlavatá, 1992) i adventivních nodálních kořenů kukuřice (*Z. mays*), (Justin & Armstrong, 1991b; He *et al.*, 1992) i u adventivních nodálních kořenů banánovníku (*Musa* spp.), které také vytvářejí indukovaný aerenchym (Aguilar *et al.*, 1999). Ke stejnému výsledku dospěly i práce pěstující kukuřici (*Z. mays*) v zavzdušňované hydroponii s přimíseným agarem (Enstone & Peterson, 2005), nebo v substrátech lépe simulujících přirozené podmínky, jako je navlhčený perlit (Lenochová, submitted), písek (Enstone & Peterson, 2005) nebo specificky upravený jíl s porozitou 0,73 (objemový podíl), (He *et al.*, 1996a). Oproti tomu existují práce, které zamítají tvorbu aerenchymu v kontrolních rostlinách, jako například u hlavních kořenů nebo adventivních nodálních kořenů kukuřice (*Z. mays*) v provzdušňované hydroponii (Gunawardena *et al.*, 2001; Konings & de Wolf, 1984; He *et al.*, 1996b), nebo u jejích adventivních nodálních kořenů při pěstování v granulované hlíně (Mano *et al.*, 2006). Pozorovaný rozpor mezi jednotlivými pracemi v popisu tvorby indukovaného aerenchymu u různých druhů rostlin pěstovaných v hydroponii by mohl být vysvětlen odlišnou mírou provzdušňování v jednotlivých pokusech, avšak mnohé práce neuvádějí konkrétní hodnoty vhánění kyslíku, a proto nelze vyvodit jednotný závěr ohledně působení provzdušňované hydroponie na vznik aerenchymu. Výrazný vliv na odlišné výsledky by mohl mít i použitý kultivar (viz dále). Rozsah tohoto specializovaného pletiva je odlišný v různých částech kořene (Aguilar *et al.*, 1999), což by mohlo vysvětlovat rozpor pozorovaný ve výsledcích práce Gunawardena *et al.*, (2001). Tito autoři nepozorovali tvorbu aerenchymu v provzdušňované hydroponii, avšak při podrobném přezkoumání jejich výsledků jsem zjistila, že pozorovali řezy získané z oblasti blízké vrcholu kořene a v oblasti poblíž báze šest dní starých kořenů. V těchto oblastech se však příliš aerenchymu nevytváří (viz dále). Pro sledování tohoto pletiva je důležitá i délka kultivace, neboť ze začátku u adventivních mezokotylárních kořenů kukuřice (*Z. mays*) pěstované v provzdušňované hydroponii nepozorovali Bouranis *et al.*, (2006) žádnou tvorbu aerenchymu, avšak po dvanácti dnech již bylo možné zaznamenat toto specializované pletivo. Vedle vlivu délky kultivace, mohou být zdrojem variability mezi výsledky jednotlivých prací jednak typ použité kultivace a jednotlivé kroky během postupu, účinnost provzdušňování média, typ

sledovaného kořene, stáří rostliny, stáří zkoumaného pletiva a také kultivar. Lenochová, (submitted), zjistila, že dvanáct zkoumaných kultivarů kukuřice (*Z. mays*) se odlišuje rozsahem vytvářeného aerenchymu, avšak u každého kultivaru se alespoň nějaký aerenchym našel. Podobné výsledky byly získány v adventivních nodálních kořenech sedmnácti kultivarů kukuřice (*Z. mays*), (Mano *et al.*, 2006) nebo v nodálních kořenech dvou kultivarů banánovníku (*Musa spp.*), (Aguilar *et al.*, 1999). I když rýže (*Oryza sativa*) vytváří konstitutivní aerenchym, i u této rostliny je ovlivnitelný rozsah jeho tvorby u různých genotypů (Colmer *et al.*, 1998; Justin & Armstrong, 1991a). Zdrojem rozdílů v tvorbě aerenchymu by mohl být i odlišný obsah živin při užití různých kultivačních roztoků. Nedostatek živin, zejména dusíkatých látek a fosfátů, zvyšuje citlivost pletiv k ethylenu (kap. 2.2.2.3.), který následně způsobuje indukci tvorby aerenchymu u kukuřice (*Z. mays*), (He *et al.*, 1992). Totéž bylo pozorováno při nedostatku dusíkatých látek u rákosu (*Phragmites australis*), který však vytváří lyzigenní aerenchym konstitutivně a je ovlivněn pouze jeho podíl (Erhart, 2000). Nadbytek dusíku v substrátu způsobuje naopak redukci tvorby aerenchymu u kukuřice (*Z. mays*), (Kubica & Baluška, 1989). Podnětem pro tvorbu aerenchymu může být i mechanický odpor substrátu (He *et al.*, 1996a), což by vysvětlovalo tvorbu aerenchymu při pěstování kukuřice (*Z. mays*) ve výše zmíněném perlitu, písku či specificky upraveném jílu. Hypoxie a mechanický odpor půdy působí synergicky na stimulaci aktivity ACC syntázy, důležitého enzymu zahrnutého v syntéze ethylenu, a tudíž není překvapující zjištění, že v zaplaveném písku bylo tvořeno více aerenchymu než v provzdušňované hydroponické kultivaci (Hlavatá, 1992). Z důvodu odstranění nežádoucího vlivu příliš velkého mechanického odporu substrátu jsem se rozhodla vyzkoušet tzv. kultivaci v papíru (diskutováno v kap. 5.1.), jež navíc umožňuje zajištění maximálního možného nasycení kořenů kyslíkem a tudíž odstranění negativního vlivu hypoxického stresu. Ani u tohoto typu kultivace však nebylo zamezeno vytváření určitého množství aerenchymu.

Skutečnost, že kořeny kukuřice (*Z. mays*) vytvářejí aerenchym při kultivacích ve velice krátkém časovém úseku, a to i za optimálních laboratorních podmínek (vysoké procento nasycení kyslíkem, nízký mechanický odpor substrátu, dostatek živin, žádný výskyt patogenů), které mohou být v přírodě jen stěží splněny, nahrává myšlence, že se tvoří aerenchym u kukuřice (*Z. mays*) alespoň v určité malé míře konstitutivně. Tuto hypotézu podporuje konstitutivní tvorba aerenchymu, jaká byla nalezena u předchůdců kukuřice, tzv. teosinte (Mano *et al.*, 2006) nebo u příbuzné *Tripsacum dactyloides* (Clark *et al.*, 1998). Je však možné, že tato tvorba je způsobená pouze velice vysokou citlivostí

kukuřice (*Z. mays*) na různé podněty, kdy například při jen nepatrném poklesu obsahu kyslíku v médiu je indukován vznik tohoto specializovaného pletiva. Tento problém by zasloužil detailnější studii.

Díky odlišnostem ve vytváření aerenchymu podél kořene (Aguilar *et al.*, 1999) byly pro detailní analýzu plochy aerenchymu u kukuřice (*Z. mays*) vybrány tři oblasti - oblast poloviny, tři čtvrtin a báze hlavního kořene (oblast A, B, popř. C), jež pomohly získat detailnější představu o gradientu tvorby aerenchymu podél kořenů příslušných variant. Vedle této závislosti sledované podél kořenů jednotlivých variant byla porovnávána i každá oblast mezi variantami, což však lze provést pouze s určitou opatrností, neboť byly srovnávány mezi sebou kořeny odlišných délek. Tudíž při tomto postupu jsou nejbližší skutečnosti závěry pocházející z porovnávání oblasti báze hlavního kořene. Pro sledování plochy aerenchymu jsem použila jednak ruční řezy, jednak trvalé preparáty. Jak se však ukázalo, pro tento typ sledování je výhodnější použití ručních řezů, a to kvůli rychlosti jejich přípravy. Tento typ řezů také vyloučil riziko negativního ovlivnění výsledků zpracováním trvalých preparátů zejména při jejich tzv. žehlení, následujícího po řezání na mikrotomu, kdy vzhledem k přítomnosti značného množství aerenchymu docházelo velmi často k potrhání pletiv, čímž se staly výsledky špatně hodnotitelné. Dále bylo nutné vyřadit řezy pocházející z oblasti vyrůstajícího postranního kořene, které by mohly zásadně ovlivnit konečné výsledky, neboť v blízkosti těchto kořenů se aerenchym nevytváří, což dokládají i jiné práce (Seago *et al.*, 1999a; Armstrong *et al.*, 2000; Enstone & Peterson, 2005), (kap. 2.3.3.).

Lyzigenní aerenchym vzniká odumíráním určitých buněk v primární kůře prostřednictvím programované buněčné smrti, kde ethylen, jehož množství se zvyšuje po nástupu hypoxických podmínek, tvoří článek signální dráhy vedoucí k tomuto procesu (Gunawardena *et al.*, 2001; He *et al.*, 1992). Syntéza ethylenu je ovlivnitelná světelnými podmínkami. Není tedy překvapující, že i rozsah tvorby aerenchymu je závislý na světle. Téměř žádný aerenchym jsem nepozorovala v oblasti báze kořene kukuřice (*Z. mays*) pěstované za fotoperiody 16/8, což je v souladu s výsledky i jiných autorů, např. Lenochová, (submitted). Nejrozsáhlejší aerenchym tato autorka popsala v polovině hlavního kořene (tj. oblast A). Mé výsledky dokládají, že v oblasti A i B se vytváří obdobný rozsah plochy aerenchymu, který je oproti ostatním částem kořene průkazně vyšší, což bylo zjištěno podobně za oblastí B u rýže (*O. sativa*), (Justin & Armstrong, 1991b). Nejrozsáhlejší tvorbu mezi oblastmi A a B pozoroval také Aguilar *et al.*, (1999) u banánovníku (*Musa spp.*), naopak nejmenší plochu zjistil mezi oblastí B a C, tedy nikoliv

až u báze, kde bylo sledováno určité zvýšení jeho plochy. Toto však bylo pozorováno pouze u jednoho ze zkoumaných kultivarů banánovníku (*Musa* spp.) pěstovaných hydroponickou kultivací a domnívám se, že jde spíše o výjimku. Za stálé tmy jsem u kukuřice (*Z. mays*) pozorovala obecně větší množství aerenchymu než u rostlin pěstovaných za normálního osvětlení, trend mezi jednotlivými oblastmi dané varianty však byl ve většině případů obdobný. Odlišné odpovědi rostlin při kultivaci v kultivační místnosti a klimatickém boxu se zde projeví tím, že při kultivaci v klimaboxu se získané hodnoty z kontrolních rostlin pěstovaných za fotoperiody 16/8 velice blížily hodnotám z kontrolních rostlin pěstovaných za stálé tmy, což potvrdilo možnost nedostatečného osvětlení v klimatickém boxu. Navíc je pravděpodobné, že kvůli menším rozměrům klimaboxu a nižší cirkulaci vzduchu oproti kultivační místnosti, mohlo dojít k akumulaci ethylenu vytvořeného rostlinami, což mohlo ovlivnit pozorované chování rostlin.

Ačkoliv je z mnoha prací zřejmé, že syntéza ethylenu je kladně ovlivnitelná dalším fytohormonem, auxinem, prostřednictvím jeho účinku na enzym ACC syntázu (Abel *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001), vztah mezi auxinem a vznikem aerenchymu v literatuře není téměř zmiňován. Tato práce zjišťovala, jak různé ovlivnění syntézy ethylenu má vliv na vznik aerenchymatického pletiva v hlavních kořenech kukuřice (*Z. mays*) a zda koncentrace auxinu stimulující růst nadzemních i podzemních rostlinných orgánů dokáže obnovit tvorbu aerenchymu inhibovanou aplikací 1-AOA.

Koncentrace $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA, stimulující růst nadzemních i podzemních orgánů kukuřice (*Z. mays*), neměla v obou kultivačních místech téměř žádný vliv na změnu poměru v tvorbě aerenchymu mezi jednotlivými oblastmi podél osy hlavního kořene, který byl pozorován u kontrolních rostlin. Při porovnání oblastí mezi jednotlivými variantami způsobila tato koncentrace při kultivaci v kultivační místnosti za normálního osvětlení zvýšení tvorby aerenchymu oproti kontrole, avšak inhibici u varianty za stálé tmy. Naproti tomu v klimaboxu byly shledány jen nepatrné rozdíly mezi všemi variantami, zřejmě kvůli odlišným hodnotám osvětlení a akumulaci ethylenu diskutovaným výše. Podobný stimulační účinek na tvorbu aerenchymu v druhém páru adventivních kořenů kukuřice (*Z. mays*) za normálního osvětlení měla koncentrace $1 \cdot 10^{-9}$ M 1-NAA (Justin & Armstrong, 1991b). Tato práce sledovala také účinky vyšších koncentrací auxinu, konkrétně $1 \cdot 10^{-8}$ M až $1 \cdot 10^{-5}$ M, které inhibovaly růst rostlinných orgánů, avšak rozsah aerenchymu nebyl ani po osmi dnech ovlivněn. Nicméně toto tvrzení je v rozporu s prací Konings & de Wolf (1984), kde autoři pozorovali, že 1-NAA v koncentracích $1 \cdot 10^{-6}$ M a $1 \cdot 10^{-5}$ M, které způsobovaly inhibici růstu hlavních kořenů, také redukovaly plochu vytvořeného

aerenchymu. Rozdíly v účinnosti jednotlivých koncentrací syntetického analogu auxinu mohly být způsobeny řadou faktorů, z nichž některé byly vyjmenované v první části této kapitoly, jako například určitými odlišnými kroky v postupu hydroponické kultivace, odlišným typem sledovaného kořene či zkoumáním jiného kultivaru. Navíc tito autoři zjistili, že ovlivnění rozsahu tvorby aerenchymu závisí také na délce působení auxinu a na způsobu vyjádření plochy aerenchymu (procento plochy celé primární kůry vs. podíl plochy aerenchymu ve střední primární kůře, kap. 4.2.). Při působení 1-NAA v koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ po dobu osmi dní došlo, jak již bylo řečeno, ke zvýšení tvorby aerenchymu, avšak při snížení doby působení pouze na tři dny nebyl vznik aerenchymu nikterak ovlivněn. Z tohoto důvodu se Justin *et al.*, (1991a) domnívají, že žádná koncentrace auxinu nezpůsobuje redukci plochy aerenchymu, a snížení tvorby aerenchymu v článku Konings & de Wolf (1984) vysvětlují příliš krátkou dobou působení auxinu. K potvrzení či vyvrácení těchto závěrů by bylo potřeba další studie.

Při zablokování syntézy ethylenu prostřednictvím $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA jsem pozorovala u všech oblastí porovnávaných mezi jednotlivými variantami snížení tvorby aerenchymu v primární kůře kukuřice (*Z. mays*). Tyto výsledky odpovídají práci Lenochové, (submitted). Změny v gradientu relativní plochy aerenchymu podél osy kořene však nebyly zaznamenány ani u jednoho ze zkoušených typů osvětlení. Při použití poloviční koncentrace inhibitoru došlo k významnému snížení plochy aerenchymu u rostlin pěstovaných za normálního osvětlení, kdežto ve stálé tmě nebyl naměřen signifikantně odlišný rozsah aerenchymu od příslušné kontroly bez inhibitoru. Jak již bylo řečeno v předchozích kapitolách, tma či snížené osvětlení zřejmě stimuluje syntézu ethylenu, který následně indukuje vznik aerenchymu, což by vysvětlovalo nižší inhibiční účinek obou použitých koncentrací inhibitoru syntézy ethylenu při aplikaci ve stálé tmě. Úplnou inhibici tvorby aerenchymu u hlavních kořenů kukuřice (*Z. mays*) způsobuje až koncentrace $900 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA (Lenochová, submitted). Inhibici tvorby aerenchymu vyvolávají i jiné látky, například inhibitor produkce ethylenu, AgNO_3 , který v koncentracích $5 \cdot 10^{-8} \text{M}$ až $6 \cdot 10^{-7} \text{M}$ způsobuje vymizení aerenchymu v adventivních kořenech kukuřice (*Z. mays*) a podobně funguje i inhibitor syntézy ethylenu AVG v koncentracích $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (He *et al.*, 1992).

Přesto, že byl pozorován protichůdný vliv 1-NAA a 1-AOA na vznik aerenchymu, po současné aplikaci 1-NAA v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ a 1-AOA v koncentraci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ bylo jejich působení spíše aditivní. Společné působení těchto látek způsobilo při porovnání oblastí mezi variantami téměř absolutní inhibici vzniku aerenchymu za normálních

světelných podmínek a poloviční inhibici ve stálé tmě oproti příslušným kontrolním kořenům kukuřice (*Z. mays*). Oproti ostatním kultivacím s jednotlivými látkami jsem u rostlin za fotoperiody 16/8 při aplikaci inhibitoru pozorovala změnu v gradientu relativní plochy aerenchymu mezi jednotlivými oblastmi podél osy kořene.

5.4. Změny v tloušťce primární kůry

Zvyšování radiální expanze buněk způsobující radiální tloušťnutí hypokotyly je jednou ze tří reakcí na ethylen u etiolovaných rostlin hrachu (*Pisum sativum*) nebo například huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), nazývaných souhrnně tzv. triple response (česky: „trojí odpověď“), (Guzmán & Ecker, 1990). V této práci jsem sledovala, jak ethylen ovlivňuje změny v tloušťce primární kůry hlavních kořenů kukuřice (*Zea mays*) při inhibici či zvýšení jeho syntézy (pomocí 1-AOA, popř. 1-NAA), a to za normálního osvětlení a za stálé tmy. Pro tento typ sledování byly využity ruční řezy z oblasti báze, neboť v těchto místech jsou pletiva při porovnávání různě dlouhých kořenů zhruba stejného stáří.

V kultivační místnosti se u kontrolních rostlin za stálé tmy tvořila nepatrně silnější nebo podobně široká primární kůra, jaká byla zaznamenána při fotoperiodě 16/8. Naproti tomu kultivace v klimaboxu způsobila ve stálé tmě snížení její tloušťky. Zesílení primární kůry za stálé tmy je možné vysvětlit prostřednictvím v předchozích kapitolách diskutovaného zvýšení produkce ethylenu za tmy, přičemž chování rostlin v klimaboxu bylo zřejmě ovlivněno ještě dalším parametrem (odlišnosti mezi kultivačními místy viz kap. 3.2.2.).

Při aplikaci 1-NAA v koncentraci $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ došlo za fotoperiody 16/8 v obou kultivačních místech k zesílení primární kůry, pravděpodobně prostřednictvím pozitivního vlivu této látky na syntézu ethylenu, avšak ve stálé tmě vykazoval auxin u obou sledovaných míst opačný účinek na tloušťku primární kůry. Auxin zřejmě působí na pletiva za různých světelných podmínek odlišnými mechanismy, neboť při zkoumání délky hypokotyly huseníčku (*A. thaliana*) bylo zjištěno, že na světle tento fytohormon stimuluje jeho prodlužování, naopak ve tmě působí inhibičně, avšak nezávisle na účinku ethylenu (Smalle *et al.*, 1997; Collett *et al.*, 2000). Zesílení hlavního kořene kukuřice (*Z. mays*), způsobuje i hydroponická kultivace (Hlavatá, 1992). Tato skutečnost nahrává myšlence, že vzniklé hypoxické podmínky podporují syntézu ethylenu, jež by mohla zvyšovat tloušťku kořene (tedy nejen primární kůry). Existují však mnohé důkazy

zamítající hypotézu ethylenu jako hlavní příčiny změn v tloušťce kořene, popř. primární kůry. Žádné zesílení kořene nebylo pozorováno při pěstování rostlin kukuřice (*Z. mays*) v písku (Hlavatá, 1992), i když tento typ kultivace má výraznější vliv na tvorbu plochy aerenchymu (kap. 5.3) a tudíž zřejmě na syntézu ethylenu než hydroponická kultivace. Situaci nevyjasňuje ani práce Visser & Pierik (2007), kteří zkoumali vždy dva druhy jednoho rodu různých rostlin - řebříčku (*Achillea*), ostřice (*Carex*), kuklíku (*Geum*), jitrocele (*Plantago*), šťovíku (*Rumex*), pryskyřníku (*Ranunculus*), žluťuchy (*Thalictrum*), z nichž vždy jeden vykazoval toleranci k zaplavení a druhý byl k zaplavení citlivý. Nezjistili však žádnou korelaci odolnosti k zaplavení s průměrem kořene. Větší tloušťka kořenů kukuřice (*Z. mays*) byla pozorována i při zvýšení obsahu dusíku v substrátu (Kubica & Baluška, 1989). K podobným výsledkům došel i Erhart, (2000) u rákosu (*Phragmites australis*), u kterého se při snížené dodávce dusíku tvořily tenčí kořeny. Nedostatek živin však způsobuje vyšší citlivost pletiv k ethylenu (kap. 5.3.), což ukazuje, že ethylen pravděpodobně není hlavním aktérem ve změnách tloušťky primární kůry. K tomu se přiklání i výsledky mých experimentů z blokování syntézy ethylenu. Inhibitor syntézy ethylenu v koncentraci $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ způsobil za normálního osvětlení statisticky průkazné zesílení primární kůry. Nicméně ve stálé tmě, kdy je podpořena syntéza ethylenu, nedošlo k téměř žádnému ovlivnění primární kůry, což může naznačovat, že ethylen zřejmě neovlivňuje tloušťku primární kůry. Kombinace auxinu a inhibitoru syntézy ethylenu způsobila snížení tloušťky primární kůry hlavního kořene kukuřice (*Z. mays*), zejména za normálního osvětlení.

Je si však nutné uvědomit, že tyto zjištěné rozdíly mezi jednotlivými výsledky nebyly ve většině případů statisticky významné. K potvrzení vlivu aplikovaných látek na změnu průměru primární kůry by bylo, kvůli charakteru použitého testu, nutné provést důkladné sledování většího množství materiálu, který by pomohl vyloučit vliv velké variability malého souboru rostlin. Není však vyloučen vliv ještě dalších fytohormonů, k jejichž potvrzení by bylo třeba detailnějších studií. Co se týká tloušťky kořene, jistě by bylo zajímavé sledovat více oblastí podél kořene, neboť Hlavatá, (1992) pozorovala v hydroponicky kultivované kukuřici (*Z. mays*) nápadné ztenčení kořene ve třech čtvrtinách jeho délky.

5.5. Změny v počtu jednotlivých vrstev primární kůry

Zdrojem výkyvů v tloušťce primární kůry by mohly být změny v počtu jednotlivých vrstev této části hlavního kořene. Primární kůra kukuřice (*Zea mays*) obsahuje vždy jednu vrstvu endodermis sousedící se středním válcem. Po ní následuje několik vrstev parenchymatických buněk střední vrstvy, tzv. mezodermis, na kterou navazuje jedna či větší počet vrstev vnější primární kůry, tzv. exodermis. Pro zjišťování počtu vrstev primární kůry bylo velice výhodné použití kultivaru kukuřice (*Z. mays*) Cefran, neboť oproti mnohým dalším kultivarům vytváří pravidelnější počet vrstev primární kůry (Lenochová, submitted). Analýza byla provedena na řezech, které byly použity pro měření tloušťky primární kůry, pocházejících z oblasti báze, kde se tvoří malé množství aerenchymu, což bylo stěžejní pro toto měření. Buňky náležící exodermální vrstvě mají oproti buňkám mezodermis (střední vrstvy) buněčné stěny modifikované suberinem a ligninem (Schreiber *et al.*, 2007), (kap. 2.3.). Analýza byla dělána na neobarvených řezech podle charakteristického menšího rozměru a tmavšího zbarvení těchto buněk a ověřena obarvením určitého množství řezů pomocí floroglucinolu s kyselinou chlorovodíkovou (tzv. Wiesnerovo činidlo), (Němec, 1962; Zeier *et al.*, 1999).

Stálá tma způsobila ve většině případů u obou kultivačních míst zvýšení počtu mezodermálních vrstev oproti rostlinám pěstovaným za fotoperiody 16/8. Podobně i aplikované látky (1-NAA a/nebo 1-AOA) způsobily u většiny kořenů při obou zkoušených způsobech osvětlení zvýšení počtu vrstev mezodermis. Výjimku tvořily pouze rostliny ze stálé tmy, které byly ošetřeny inhibitorem syntézy ethylenu, u kterých ke zvýšení nedošlo.

Vrstva exodermis je silně ovlivnitelná řadou faktorů, jako například typem kultivace nebo působením různých stresů. Pozitivně na tvorbu těchto vrstev působí hypoxie (čili snížený obsah kyslíku), sucho, salinita, kyselé prostředí, patogeny, vyšší teplota, fytotoxiny nebo mechanický odpor substrátu (Enstone *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2007; Degenhardt & Gimmler, 2000; Armstrong *et al.*, 1999; Armstrong & Armstrong, 2001; Seago *et al.*, 2000b), (více viz kap. 2.3.). Nicméně v mých experimentech při obou zkoušených osvětleních v různých místech kultivace bylo pozorováno u kontrolních rostlin snížení počtu vrstev exodermis a dokonce i aplikace auxinu a/nebo inhibitoru syntézy ethylenu měla na exodermis opačný vliv, než jaký jsem očekávala díky výše uvedeným skutečnostem. Veškeré výsledky (s výjimkou exodermis po aplikaci 1-AOA) testované Repeated Measures ANOVA však ukazují statisticky nevýznamné rozdíly, proto výše

popsané odlišnosti je nutné vnímat s určitou opatrností. Opět, jako u měření tloušťky primární kůry, by bylo pro potvrzení sledovaných výsledků nutné provést větší počet měření.

Vizualizace apoplastických bariér byla též provedena v místě nacházejícím se co nejbližší kořenové špičce. Tento bod byl zvolen ve 3/8 délky hlavního kořene kukuřice (*Z. mays*), což se ukázalo jako nejzazší místo, kudy bylo možné provést ruční řez u všech kultivovaných variant. Blíže špičce byly kořeny, zejména rostlin ze stálé tmy, příliš tenké pro tento druh řezů. Všechny řezy z této oblasti měly pouze 1 vrstvu exodermálních buněk, s výjimkou řezů z rostlin pěstovaných za fotoperiody 16/8 s kombinací 1-NAA + 1-AOA, u kterých byl pozorován vyšší počet vrstev exodermis, což by mohlo být známkou tvorby této vrstvy blíže vrcholu kořene. Bylo by zajímavé v dalších experimentech vysledovat vzdálenost tvorby exodermální vrstvy od vrcholu kořene, neboť mnohé práce ukázaly, že tato vzdálenost je ovlivnitelná podmínkami prostředí (Armstrong *et al.*, 2000; Enstone & Peterson, 2005; Colmer *et al.*, 1998; Soukup *et al.*, 2004).

Po podrobném srovnání celkového počtu vrstev primární kůry a její celkové tloušťky v oblasti báze hlavního kořene se ukázalo, že změny v počtu vrstev nekorelují se změnami v její tloušťce. Rozhodla jsem se proto provést srovnání velikosti jednotlivých buněk primární kůry, konkrétně třetí vrstvy mezodermis (směrem od endodermis), neboť aerenchym u kukuřice (*Z. mays*) se za normálních podmínek vytvářel zejména v prostředních vrstvách primární kůry. K tomuto sledování byly použity trvalé preparáty (příčné a podélné řezy). Vzhledem k metodickým potížím s novým zalévacím médiem jsem však nezískala věrohodné výsledky, a z tohoto důvodu je zde neuvádím. Pokud by se podařilo optimalizovat převáděcí postup, bylo by velice zajímavé zjistit, jak auxin a/nebo inhibitor syntézy ethylenu působí na velikost buněk. Po přidání ACC, přímého prekurzoru ethylenu, k buňkám kořene huseníčku (*A. thaliana*) došlo ke zkrácení buněk v podélném směru (Růžička *et al.*, 2007). Zvýšení tloušťky kořenů kukuřice (*Z. mays*) při aplikaci vyšších dávek dusíku do substrátu bylo také způsobeno stimulací objemového růstu buněk a nikoliv tvorbou více vrstev primární kůry kořene (Kubica & Baluška, 1989).

5.6. Zjišťování počtu a průměru cév pozdního metaxylému

Doplňkovým hodnocením anatomických charakteristik hlavních kořenů kukuřice (*Zea mays*) bylo zjišťování komplexity uspořádání středního válce - počtu a průměru cév pozdního metaxylému ve třech vybraných oblastech při působení 1-NAA a/nebo 1-AOA.

Podobně jako u zjišťování plochy aerenchymu byly výsledky srovnávány na dvou úrovních - jednak byla získaná data porovnáвана v dané oblasti hlavního kořene mezi jednotlivými variantami a jednak jednotlivé oblasti dané varianty. Je však nutné mít na paměti, že největší hodnotu mají výsledky získané z báze kořene (tzv. oblast C), neboť zde jsou pletiva obdobného stáří, a díky rozdílným délkám kořenů sledovaných rostlin je porovnávání dat získaných z poloviny (Himanen *et al.*, 2002) a tří čtvrtin (Himanen *et al.*, 2002) délky kořene mezi variantami určitým způsobem zavádějící.

U kontrolních rostlin kukuřice (*Z. mays*) za obou sledovaných osvětlení byla zjištěna vzestupná tendence počtu cév od poloviny HK po jeho bázi (z oblasti A do C), podobně jako u ječmene (*Hordeum vulgare*), (Luxová, 1991; Luxová, 1986). I když byly při podrobnějším porovnávání výsledků získaných u kukuřice (*Z. mays*) nalezeny určité drobné změny v počtu cév pozdního metaxylému po aplikaci 5.10^{-11} M 1-NAA a/nebo 200.10^{-6} M 1-AOA, test Repeated Measures ANOVA neukázal žádné statisticky významné rozdíly. Žádné změny v počtu těchto cév neprokázalo ani testování vlivu hypoxie na metaxylém hlavních kořenů kukuřice (*Z. mays*) kultivaru CE 250 (Hlavatá, 1992).

Hypoxické podmínky neovlivňovaly ani průměr cév pozdního metaxylému kukuřice (*Z. mays*), (Hlavatá, 1992). Nicméně v mých experimentech měření průměru cév pozdního metaxylému ukázalo u většiny případů statisticky významné rozdíly. Kontrolní rostliny tvořily u obou typů osvětlení největší cévy v oblasti B, naopak nejmenší se nacházely v oblasti C. Zvýšení průměru cév v akropetálním směru bylo pozorováno i u ječmene (*H. vulgare*), (Luxová, 1991; Luxová, 1986). Při testování vlivu auxinu a/nebo inhibitoru syntézy ethylenu na průměr cév byly zjištěny statistické rozdíly při srovnávání oblastí podél osy kořene i mezi jednotlivými variantami dané oblasti. Po aplikaci testovaných látek docházelo ke změnám v poměrech mezi jednotlivými oblastmi dané varianty (konkrétně při aplikaci 1-NAA v kultivační místnosti za stálé tmy, při aplikaci 1-AOA za fotoperiody 16/8 a při současné aplikaci 1-NAA + 1-AOA za obou sledovaných osvětlení). Navíc test Repeated Measures ANOVA po aplikaci kombinace obou látek ukázal statisticky významné rozdíly v oblasti B mezi variantami při obou zkoušených osvětleních, které byly zapříčiněny snížením průměru cév pozdního metaxylému oproti příslušným kontrolám.

Dalším zajímavým pozorováním by mohlo být zjišťování průměru středního válce při působení auxinu a/nebo inhibitoru ethylenu, což by mohlo přispět k vysvětlení pozorovaného tloušťnutí hlavních kořenů při působení hypoxie a současnému zachování tloušťky primární kůry.

6. SHRnutí VÝSLEDKŮ

Získané výsledky dokumentují vliv fytohormonů - ethylenu a auxinu, na vývoj struktury hlavního kořene kukuřice seté (*Zea mays*), zejména na rozvoj aerenchymu. Byl potvrzen významný vliv kultivačních podmínek, zejména osvětlení a typu kultivace. U anatomických měření byla ukázána důležitost použití správného statistického testu.

Růstové charakteristiky:

Auxin (1-NAA):

- Koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ působí stimulaci délky i hmotnosti většiny nadzemních i podzemních orgánů, zatímco vyšší koncentrace způsobují inhibici, a to nezávisle na typu kultivace
- Účinky auxinu jsou výraznější za fotoperiody 16/8
- Zjištěny výrazné rozdíly ve výsledcích z papírových kultivací v klimaboxu nebo v kultivační místnosti

Inhibitor syntézy ethylenu (1-AOA):

- Koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ redukuje růst nadzemních i podzemních orgánů, koncentrace $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$ má nižší inhibiční účinky
- Účinky inhibitoru jsou výraznější za fotoperiody 16/8

Kombinace auxinu (1-NAA) a inhibitoru syntézy ethylenu (1-AOA):

- Koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA s $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA za fotoperiody 16/8 inhibuje růst nadzemních i podzemních orgánů
- Za stálé tmy stimuluje suchou hmotnost prýtu, inhibuje růst HK

Analýza plochy aerenchymu

- Stálá tma podporuje tvorbu aerenchymu
- Nejméně aerenchymu naměřeno u báze, nejvíce v polovině kořene
- 1-NAA a/nebo 1-AOA nemění tento poměr
- Zjištěny výrazné odlišnosti mezi výsledky z klimaboxu a z kultivační místnosti
- Koncentrace $5 \cdot 10^{-11} \text{M}$ 1-NAA tvorbu aerenchymu za fotoperiody 16/8 stimuluje, za stálé tmy oproti příslušné kontrole inhibuje
- Koncentrace $200 \cdot 10^{-6} \text{M}$ i $100 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 1-AOA inhibuje tvorbu aerenchymu za obou použitých osvětlení
- Inhibice při současné aplikaci 1-NAA + 1-AOA výraznější za fotoperiody 16/8

Tloušťka a počet vrstev primární kůry

- Žádné statisticky průkazné rozdíly nebyly zjištěny při použití $5 \cdot 10^{-11}$ M 1-NAA a/nebo $200 \cdot 10^{-6}$ M 1-AOA u tloušťky primární kůry, počtu vrstev mezodermis a při současném působení těchto látek ani v počtu vrstev exodermis
- Jediným statisticky průkazným rozdílem bylo ztloustnutí primární kůry po aplikaci 1-AOA za fotoperiody 16/8
- Snížení počtu vrstev exodermis způsobuje 1-NAA či 1-AOA za obou osvětlení

Počet a průměr cév pozdního metaxylému

- Zjištěna vzestupná tendence počtu cév od poloviny HK k jeho bázi nezávisle na osvětlení a místu kultivace
- Největší cévy zjištěny v oblasti třech čtvrtin kořene, nejmenší v oblasti báze nezávisle na osvětlení a místu kultivace
- Poměr průměru cév podél osy kořene změněn po aplikaci 1-AOA za fotoperiody 16/8 a při aplikaci 1-NAA + 1-AOA za obou typů osvětlení; poměr v počtu cév podél osy kořene změněn po aplikaci 1-NAA + 1-AOA za obou typů osvětlení
- 1-NAA redukuje počet cév zejména za stálé tmy, 1-AOA naopak počet stimuluje za obou typů osvětlení, kombinace působí stimulačně za stálé tmy

8. PŘÍLOHA

8.1. Vliv provzdušňování kultivačního roztoku

V desetidenní hydroponické kultivaci bylo ověřováno, jak obsah kyslíku v médiu ovlivňuje růst rostlin kukuřice (*Zea mays*). Rostliny byly pěstovány za normální fotoperiody buď po celou dobu kultivace v provzdušňovaném živném roztoku, nebo v médiu bez provzdušňování (obr. 8.1, 8.2). Korekce pH byla provedena pouze na začátku kultivace, pH bylo nastaveno na hodnotu 5,5.

Hypoxický stres se projevil zejména dobře patrným zpomalením růstu listů i hlavního kořene (tab. 8.1).

Tab. 8.1: Biometrické charakteristiky rostlin pěstovaných za normálních světelných podmínek s/bez provzdušňování roztoku, kultivační místnost, hydroponie (uvedeny průměrné hodnoty a SE)

Sledovaný parametr	provzdušňováno	neprovzdušňováno
délka listů [mm]	224,00 ± 5,4848	177,80 ± 4,4308
hmotnost listů [g]	1,6245 ± 0,0695	0,9668 ± 0,0263
hmotnost sušiny listů [g]	0,1292 ± 0,0054	0,0765 ± 0,0022
délka mezokotylu [mm]	6,5000 ± 0,3997	7,4000 ± 0,4561
hmotnost mezokotylu [g]	0,0287 ± 0,0016	0,1183 ± 0,0810
hmotnost sušiny mezokotylu [g]	0,0026 ± 0,0003	0,0026 ± 0,0003
hmotnost obilky [g]	0,3843 ± 0,0158	0,3661 ± 0,0111
hmotnost sušiny obilky [g]	0,1318 ± 0,0086	0,1271 ± 0,0062
délka hlavního kořene [mm]	256,75 ± 4,1740	141,00 ± 2,1909
hmotnost hlavního kořene [g]	0,6715 ± 0,0333	0,3630 ± 0,0174
počet rostlin [počet]	12 (prýt) / 8 (kořen)	5



Obr. 8.1 a 8.2: Srovnání růstových charakteristik rostlin pěstovaných za normálního osvětlení s provzdušňovaným a neprovzdušňovaným roztokem

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Abel S, Nguyen MD, Chow W, Theologis A. 1995.** ASC4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 19093-19099.
2. **Aguilar EA, Turner DW, Sivasithamparam K. 1999.** Aerenchyma formation in roots of four banana (*Musa* spp.) cultivars. *Scientia Horticulturae* **80**: 57-72.
3. **Albrecht G, Biemelt S. 1998.** A comparative study on carbohydrate reserves and ethanolic fermentation in the roots of two wetland and non-wetland species after commencement of hypoxia. *Physiologia Plantarum* **104**: 81-86.
4. **Apelbaum A, Burg SP. 1972.** Effect of ethylene on cell division and deoxyribonucleic acid synthesis in *Pisum sativum*. *Plant Physiology* **50**: 117-124.
5. **Apelbaum A, Fisher JB, Burg SP. 1972.** Effect of ethylene on cellular differentiation in etiolated pea seedlings. *American Journal of Botany* **59**: 697-705.
6. **Armstrong J, Afreen-Zobayed F, Blyth S, Armstrong W. 1999.** *Phragmites australis*: effects of shoot submergence on seedling growth and survival and radial oxygen loss from roots. *Aquatic Botany* **64**: 275-289.
7. **Armstrong J, Armstrong W. 2001.** Rice and *Phragmites*: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *American Journal of Botany* **88**: 1359-1370.
8. **Armstrong J, Armstrong W. 1990.** Pathways and mechanisms of oxygen transport in *Phragmites australis*. In: Cooper PF, Findlater BC, eds. *In Constructed Wetlands in Water Pollution Controls*. Pergamon Press, 529-534.
9. **Armstrong J, Armstrong W. 1994.** Chlorophyll development in mature lysigenous and schizogenous root aerenchymas provides evidence of continuing cortical cell viability. *New Phytologist* **126**: 493-497.
10. **Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner DW, Beckett PM. 2000.** Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* **86**: 687-703.
11. **Baxter-Burrell A, Yang Z, Springer PS, Bailey-Serres J. 2002.** RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science* **296**: 2026-2028.
12. **Beekman T, Burssens S, Inze D. 2001.** The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **52**: 403-411.

13. **Begg CBM, Kirk GJD, Mackenzie AF, Neue HU. 1994.** Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. *New Phytologist* **128**: 469-477.
14. **Benjamins R, Malenica N, Lusching Ch. 2005.** Regulating the regulator: the control of auxin transport. *BioEssays* **27**: 1246-1255.
15. **Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jurgens G, Friml J. 2003.** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591-602.
16. **Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G. 2002a.** Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *The Plant Journal* **29**: 325-332.
17. **Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G. 2002b.** Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **29**: 325-332.
18. **Blakely LM, Durham M, Evans TA, Blakely RM. 1982.** Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. *Botanical Gazette* **143**: 341-352.
19. **Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS. 2005.** Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 494-500.
20. **Bleecker AB, Kende H. 2000.** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 1-18.
21. **Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005.** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.
22. **Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Vanonckelen H, Vanmontagu M, Inze D. 1995.** *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *The Plant Cell* **7**: 1405-1419.
23. **Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Kollias Ch, Maniou P, Protonotarios VE, Siyiannis VF, Hawkesford MJ. 2006.** Dynamics of aerenchyma distribution in the cortex of sulfate-deprived adventitious roots of maize. *Annals of Botany* **97**: 695-704.
24. **Bragina TV, Rodionova NA, Grinieva GM. 2003.** Ethylene production and activation of hydrolytic enzymes during acclimation of maize seedlings to partial flooding. *Russian Journal of Plant Physiology* **50**: 794-798.
25. **Callis J. 2005.** Plant biology - Auxin action. *Nature* **435**: 436-437.

26. **Campbell R, Drew MC. 1983.** Electron-microscopy of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to oxygen shortage. *Planta* **157**: 350-357.
27. **Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inze D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M. 2001.** Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* **13**: 843-852.
28. **Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, Klee HJ. 1999.** Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology* **121**: 53-59.
29. **Clark RB, Alberts EE, Zobel RW, Sinclair TR, Miller MS, Kemper WD, Foy CD. 1998.** Eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*) root penetration into and chemical properties of claypan soils. *Plant and Soil* **200**: 33-45.
30. **Collett CE, Harberd NP, Leyser O. 2000.** Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Plant Physiology* **124**: 553-561.
31. **Colmer TD. 2003.** Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment* **26**: 17-36.
32. **Colmer TD, Gibberd MR, Wiengweera A, Tinh TK. 1998.** The barrier to radial oxygen loss from roots of rice (*Oryza sativa* L.) is induced by growth in stagnant solution. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1431-1436.
33. **Cram DJ, Hammond GS. 1969.** *Organická chemie*. Praha: Československá akademie věd.
34. **Degenhardt B, Gimmler H. 2000.** Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany* **51**: 595-603.
35. **Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. 2005.** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.
36. **Dolferus R, Ellis M., de Bruxelles G, Trevaskis B, Hoeren F, Dennis ES, Peacock WJ. 1997.** Strategies of gene action in *Arabidopsis* during hypoxia. *Annals of Botany* **79**: 21-31.
37. **Drew MC. 1997.** Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review Plant Physiology of Plant Molecular Biology* **48**: 223-250.
38. **Drew MC. 1983.** Plant Injury and Adaptation to Oxygen Deficiency in the Root Environment - A Review. *Plant and Soil* **75**: 179-199.
39. **Drew MC, He CJ, Morgan PW. 2000.** Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science* **5**: 123-127.
40. **Ecker JR. 1995.** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**: 667-675.

41. **Enstone DE, Peterson CA. 1998.** Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant, Cell and Environment* **21**: 837-844.
42. **Enstone DE, Peterson CA. 2005.** Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, Cell and Environment* **28**: 444-455.
43. **Enstone DE, Peterson CA, Ma F. 2003.** Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 335-351.
44. **Erhart L. 2000.** Růst, struktura a větvení kořenů rostlin rákosu obecného ovlivněného množstvím dusíku v substrátu. *Diplomová práce* Praha.
45. **Esau K. 1965.** *Anatomy of seed plants*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
46. **Evans DE. 2003.** Aerenchyma formation. *New Phytologist* **161**: 35-49.
47. **Finlayson SA, Gohil HL, Noguchi HK, Lee IJ, Morgan PW. 2004.** Circadian ethylene synthesis in *Sorghum bicolor*: expression and control of the system at the whole plant level. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**: 29-36.
48. **Finlayson SA, Lee IJ, Morgan PW. 1998.** Phytochrome B and the regulation of circadian ethylene production in *Sorghum*. *Plant Physiology* **116**: 17-25.
49. Friml J. kfrserver.natur.cuni.cz/cz/edu/vývoj/Part2.ppt. 2003.
Ref Type: Internet Communication
50. **Friml J. 2007.** Auxin - univerzální vývojový signál v životě rostlin. *Živa* 8-11.
51. **Friml J, Benková E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G, Palme K. 2002a.** AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 661-673.
52. **Friml J, Palme K. 2002.** Polar auxin transport - old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* **49**: 273-284.
53. **Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G. 2003.** Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147-153.
54. **Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K. 2002b.** Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**: 806-809.
55. **Gälweiler L, Guan CH, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K. 1998.** Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**: 2226-2230.
56. **Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jurgens G, Palme K. 2001.** Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**: 425-428.

57. **Gunawardena AHLA, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE. 2001.** Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* **212**: 205-214.
58. **Gunawardena AHLAN. 2008.** Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *Journal of Experimental Botany* **59**: 445-451.
59. **Guzmán P, Ecker JR. 1990.** Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell* **2**: 513-523.
60. **Haberlandt G. 1965.** *Physiological Plant Anatomy*. New Delhi: Today & Tomorrow's Book Agency.
61. **Hansen H, Grossmann K. 2000.** Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* **124**: 1437-1448.
62. **Haver DL, Schuch UK, Lovatt CJ. 2003.** Exposure of petunia seedlings to ethylene decreased apical dominance by reducing the ratio of auxin to cytokinin. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 459-468.
63. **He CJ, Drew MC, Morgan PW. 1994.** Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen starvation. *Plant Physiology* **105**: 861-865.
64. **He CJ, Finlayson SA, Drew MC, Jordan WR, Morgan PW. 1996a.** Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiology* **112**: 1679-1685.
65. **He CJ, Morgan PW, Drew MC. 1996b.** Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiology* **112**: 463-472.
66. **He CJ, Morgan PW, Drew MC. 1992.** Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen- or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. *Plant Physiology* **98**: 137-142.
67. **Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, Engler JD, Inze D, Beeckman T. 2002.** Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell* **14**: 2339-2351.
68. **Hinchee MA, Rost TL. 1986.** The control of lateral root development in cultured *Pea* seedlings. I. The role of seedling organs and plant growth regulators. *Botanical Gazette* **147**: 137-147.
69. **Hlavatá Z. 1992.** Vliv nedostatku kyslíku na kořenový systém kukuřice *Zea mays* L. *Diplomová práce Praha*.
70. **Hoagland DR, Amon DI. 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. *Circular 347 of University of California, Agricultural Experimental Station Berkley*.

71. **Hobbie LJ. 2006.** Auxin and cell polarity: the emergence of AXR4. *Trends in Plant Science* **11**: 517-518.
72. **Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W. 2001.** The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2245-2264.
73. **Husáková E. 2006.** Regulace vývoje postranních kořenů. *Bakalářská práce Praha*.
74. **Imhoff V, Muller P, Guern J, Delbarre A. 2000.** Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **210**: 580-588.
75. **Jackson MB, Armstrong W. 1999.** Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *The Plant Biology* **1**: 274-287.
76. **Jacobs M, Gilbert SF. 1983.** Basal localization of the presumptive auxin carrier in pea stem cells. In: Taiz L, Zeiger E, eds. *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers. *Science* **220**: 1297-1300.
77. **Jönsson H, Heisler MG, Shapiro BE, Meyerowitz EM, Mjolsness E. 2006.** An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 1633-1638.
78. **Justin SHFW, Armstrong W. 1987.** The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist* **106**: 465-495.
79. **Justin SHFW, Armstrong W. 1991b.** A reassessment of the influence of NAA on aerenchyma formation in maize roots. *New Phytologist* **117**: 607-618.
80. **Justin SHFW, Armstrong W. 1991a.** Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* **118**: 49-62.
81. **Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H. 1998.** Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* **204**: 277-287.
82. **Kazama H, Dan H, Imaseki H, Wasteneys GO. 2004.** Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells. *Plant Physiology* **134**: 1614-1623.
83. **Kepinski S, Leyser O. 2005.** The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-451.
84. **Kerk NM, Jiang K, Feldman LJ. 2000.** Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiology* **122**: 925-932.

85. **Kim JH, Kim WT, Kang BG. 2001.** IAA and N⁶-Benzyladenine inhibit ethylene-regulated expression of ACC oxidase and ACC synthase genes in mungbean hypocotyls. *Plant Cell Physiology* **42**: 1056-1061.
86. **Konings H, de Wolf A. 1984.** Promotion and inhibition by plant growth regulators of aerenchyma formation in seedling roots of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* **60**: 309-314.
87. **Kossaczky E, Surový J. 1972.** *Chemické inžinierstvo II*. Bratislava: Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry.
88. **Kubica Š, Baluška F. 1989.** Maize primary root growth and differentiation under conditions of nitrate over-supply. *Biológia (Bratislava)* **44**: 407-414.
89. **Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum H, Sussex IM. 1995.** Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**: 3303-3310.
90. **Lehmann H, Stelzer R, Holzamer S, Kunz U, Gierth M. 2000.** Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* **211**: 816-822.
91. **Lenochová Z. 2008.** The influence of cultivation conditions and phytohormones on aerenchyma. *submitted*.
92. **Lenochová Z. 2004.** Programovaná buněčná smrt v kořenech kukuřice seté *Zea mays* L. v průběhu vývoje aerenchymu. *Diplomová práce* Praha.
93. **Leyser O. 2001.** Auxin. *Current Biology* **11**: 728.
94. **Leyser O. 2005.** Auxin distribution and plant pattern formation: How many angels can dance on the point of PIN? *Cell* **121**: 819-822.
95. **Li H, Johnson P, Štěpánová AN, Alonso JM, Ecker JR. 2004.** Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **7**: 193-204.
96. **Lichtenberková L. 2002.** Vývoj struktury kořene mokřadních rostlin. *Diplomová práce* Praha.
97. **Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. 2001.** Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* **28**: 465-474.
98. **Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Nonmanly J, Sandberg G. 2005.** Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **17**: 1090-1104.
99. **Luxová M. 1986.** The hydraulic safety zone at the base of barley roots. *Planta* **169**: 465-470.
100. **Luxová M. 1991.** Mechanisms of reduction of the stelar pattern along barley roots. *Botanical Acta* **104**: 163-168.

101. **Macháčková I, Chauvaux N, Dewitte W, van Onckelen H. 1997.** Diurnal fluctuations in ethylene formation in *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiology* **113**: 981-985.
102. **Mano Y, Omori F, Takamizo T, Kindiger B, Bird RM, Loaisiga CH. 2006.** Variation for root aerenchyma formation in flooded and non-flooded maize and teosinte seedlings. *Plant and Soil* **281**: 269-279.
103. **McDonald MP, Visser EJW. 2003.** A study of the interaction between auxin and ethylene in wild type and transgenic ethylene-insensitive tobacco during adventitious root formation induced by stagnant root zone conditions. *Plant Biology* **5**: 550-556.
104. **McPherson DC. 1939.** Cortical air spaces in the roots of *Zea mays* L. *New Phytologist* **38**: 190-202.
105. **Mergemann H, Sauter M. 2000.** Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiology* **124**: 609-614.
106. **Morris DA, Friml J, Zažímalová E. 2004.** The transport of auxins. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones*. Dordrecht, The Netherlands: Luwer Academic Publisher, 437-470.
107. **Morris DA, Thomas AG. 1978.** A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* **29**: 147-157.
108. **Muday GK, Peer WA, Murphy AS. 2003.** Vesicular cycling mechanisms that control auxin transport polarity. *Trends in Plant Science* **8**: 301-304.
109. **Müller A, Guan CH, Galweiler L, Tanzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K. 1998.** AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *Embo Journal* **17**: 6903-6911.
110. **Němec B. 1962.** *Botanická mikrotechnika*. Praha: Nakladatelství československé akademie věd.
111. **Paciorek T, Friml J. 2006.** Auxin signaling. *Journal of Cell Science* **119**: 1199-1202.
112. **Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou K, Palme K. 2005.** The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* **10**: 170-177.
113. **Park DK, Bitton G, Melker R. 2006.** Microbial inactivation by microwave radiation in the home environment. *Journal of Environmental Health* **69**: 17-24.
114. **Parry G, Delbarre A, Marchant A, Swarup R, Napier R, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ. 2001.** Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant Journal* **25**: 399-406.

115. **Peng HP, Chan ChS, Shih MCh, Yang SF. 2001.** Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 742-749.
116. **Perumalla ChJ, Chmielewski JG, Peterson CA. 1990a.** A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. III. Rhizomes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**: 127-132.
117. **Perumalla ChJ, Peterson CA, Enstone DE. 1990b.** A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**: 93-112.
118. **Peterson CA. 1989.** Significance of the exodermis in root function. In: Loughman BC, ed. *Structural and Functional Aspects of Transport in Roots*. Kluwer Academic Publishers, 35-40.
119. **Peterson CA, Perumalla ChJ. 1990.** A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**: 113-125.
120. **Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, Wiśniewska J, Tadele Z, Kubeš M, Čovanová M, Dhonukshe P, Skůpa P, Benková E, Perry L, Křeček P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig Ch, Zažímalová E, Friml J. 2006.** PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**: 914-918.
121. **Pickett FB, Wilson AK, Estelle M. 1990.** The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* **94**: 1462-1466.
122. **Pierik R, Verkerke W, Voeselek RACJ, Blom KWPM, Visser EJW. 1999.** Thick root syndrome in cucumber (*Cucumis sativus* L.): A description of the phenomenon and an investigation of the role of ethylene. *Annals of Botany* **84**: 755-762.
123. **Pierik R, Visser EJW, De Kroon H, Voeselek LACJ. 2003.** Ethylene is required in tobacco to successfully compete with proximate neighbours. *Plant, Cell and Environment* **26**: 1229-1234.
124. **Ponce G, Barlow PW, Feldman LJ, Cassab GI. 2005.** Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. *Plant, Cell and Environment* **28**: 719-732.
125. **Rahman A, Hosokawa S, Oono Y, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S. 2002.** Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiology* **130**: 1908-1917.

126. **Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK. 2000.** Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**: 481-490.
127. **Reed RC, Brady SR, Muday GK. 1998.** Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**: 1369-1378.
128. **Růžička K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, Friml J, Benková E. 2007.** Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell* **19**: 2197-2212.
129. **Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinohl V, Friml J, Benkova E. 2006.** Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes & Development* **20**: 2902-2911.
130. **Schreiber L, Franke R, Hartmann K. 2007.** Chemical composition of apoplastic transport barriers in roots. Quantification of suberin depositions in endodermal and hypodermal root cell walls. In: Sattelmacher B, Horst WJ, eds. *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*. 109-117.
131. **Schreiber L, Franke R, Hartmann KD, Ranathunge K, Steudle E. 2005.** The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of Experimental Botany* **56**: 1427-1436.
132. **Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J. 1999.** Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1267-1280.
133. **Seago JL, Peterson CA, Enstone DE. 2000a.** Cortical development in roots of the aquatic plant *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *American Journal of Botany* **87**: 1116-1127.
134. **Seago JL, Peterson CA, Enstone DE. 1999a.** Development of the endodermis and hypodermis of *Typha glauca* Godr. and *Typha angustifolia* L. roots. *Canadian Journal of Botany* **77**: 122-134.
135. **Seago JL, Peterson CA, Enstone DE. 1999b.** Cortical ontogeny in roots of the aquatic plant, *Hydrocharis morsus-ranae* L. *Canadian Journal of Botany* **77**: 113-121.
136. **Seago JL, Peterson CA, Kinsley LJ, Broderick J. 2000b.** Development and structure of the root cortex in *Caltha palustris* L. and *Nymphaea odorata* Ait. *Annals of Botany* **86**: 631-640.
137. **Secko D. 2007.** Hot papers - Auxin receptor hides in plain sight. *Scientist* **21**: 69-70.

138. **Shimamura S, Yoshida S, Mochizuki T. 2007.** Cortical aerenchyma formation in hypocotyl and adventitious roots of *Luffa cylindrica* subjected to soil flooding. *Annals of Botany* **100**: 1431-1439.
139. **Smalle J, Haegman M, Kurepa J, Van Montagu M, Van Der Straeten D. 1997.** Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2756-2761.
140. **Solangaarachchi SM, Gould KS. 2001.** Anthocyanin pigmentation in the adventitious roots of *Metrosideros excelsa* (Myrtaceae). *New Zealand Journal of Botany* **39**: 161-166.
141. **Sorrell BK, Mendelssohn IA, Mckee KL, Woods RA. 2000.** Ecophysiology of wetland plant roots: a modelling comparison of aeration in relation to species distribution. *Annals of Botany* **86**: 675-685.
142. **Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubová O. 2007.** Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist* **173**: 264-278.
143. **Soukup A, Malá J, Hrubcová M, Kálal J, Votrubová O, Cvikrová M. 2004.** Differences in anatomical structure and lignin content of roots of pedunculate oak and wild cherry-tree plantlets during acclimation. *Biologia Plantarum* **48**: 481-489.
144. **Soukup A, Seago JL, Votrubová O. 2005.** Developmental anatomy of the root cortex of the basal monocotyledon, *Acorus calamus* (Acorales, Acoraceae). *Annals of Botany* **96**: 379-385.
145. **Soukup A, Votrubová O, Čížková H. 2002.** Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* **153**: 277-287.
146. **Stehlíková B. 2005.** Vliv pH na růst rostlin a strukturu kořenů kukuřice seté *Zea mays* L. *Diplomová práce* Praha.
147. **Štěpánová AN, Alonso JM. 2005.** Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiologia plantarum* **123**: 195-206.
148. **Štěpánová AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM. 2005.** A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 2230-2242.
149. **Štěpánová AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM. 2007.** Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **19**: 2169-2185.
150. **Subbaiah CHC, Bush DS, Sachs MM. 1994.** Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *The Plant Cell* **6**: 1747-1762.

151. **Subbaiah CHC, Sachs MM. 2003.** Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Annals of Botany* **90**: 119-127.
152. **Suttle JC. 1988.** Effect of ethylene treatment on polar IAA transport, net IAA uptake and specific binding of *N*-1-naphthylphthalamic acid in tissues and microsomes isolated from etiolated pea epicotyls. *Plant Physiology* **88**: 795-799.
153. **Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M. 2001.** Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development* **15**: 2648-2653.
154. **Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GTS, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ. 2007.** Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *The Plant Cell* **19**: 2186-2196.
155. **Taiz L, Zeiger E. 2002.** *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts: Sinaeur Associates, Inc. Publishers.
156. **Tanimoto M, Roberts K, Dolan L. 1995.** Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **8**: 943-948.
157. **Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJJ, Dowson-Day MJ, Wang ZY, Tobin EM, Harren FJM, Millar AJ, Van Der Straeten D. 2004.** Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 3751-3761.
158. **Trainotti L, Tadiello A, Casadoro G. 2007.** The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3299-3308.
159. **Vandenbussche F, Vriezen WH, Smalle J, Laarhoven LJJ, Harren FJM, Straeten D. 2003.** Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased light intensity. *Plant Physiology* **133**: 517-527.
160. **Vartapetian BB, Jackson MB. 1997.** Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany* **79**: 3-20.
161. **Visser EJW, Bögemann GM, Blom CWPM, Voeselek LACJ. 1996.** Ethylene accumulation in waterlogged *Rumex* plants promotes formation of adventitious roots. *Journal of Experimental Botany* **47**: 403-410.
162. **Visser EJW, Colmer TD, Blom CWPM, Voeselek LACJ. 2000.** Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1237-1245.
163. **Visser EJW, Voeselek LACJ. 2004.** Acclimation to soil flooding - sensing and signal-transduction. *Plant and Soil* **254**: 197-214.

164. **Voesenek LACJ, Benschop JJ, Bou J, Cox MCH, Groeneveld HW, Millenaar FF, Vreeburg RAM, Peeters AJM. 2003.** Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Annals of Botany* **91**: 205-211.
165. **von Guttenberg H. 1968.** Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Berlin: Borntraeger, 41-84.
166. **Votrubová O. 2001.** *Anatomie rostlin*. Praha: Karolinum.
167. **Votrubová O, Votruba M. 1986.** The influence of IAA on the uptake of potassium, calcium, magnesium, water absorption and growth in young maize seedlings. *Biologia Plantarum* **28**: 460-464.
168. **Waggoner PE, Dimond AE. 1954.** Nonspecificity of the triple response for ethylene. *Science* **119**: 123-124.
169. **Wightman F, Thimann KV. 1980.** Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. 1. Sources of primordia-inducing substances in the primary root of pea-seedlings. *Physiologia Plantarum* **49**: 13-20.
170. **Wisniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer PB, Růžička K, Blilou I, Rouquie D, Scheres B, Friml J. 2006.** Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883.
171. **Xue J, Li Y, Tan H, Yang F, Ma N, Gao J. 2008.** Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene-enhanced flower opening. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2161-2169.
172. **Yang TF, Gonzalez-Carranza ZH, Maunders MJ, Roberts JA. 2008.** Ethylene and the regulation of senescence processes in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Annals of Botany* **101**: 301-310.
173. **Yu YB, Yang SF. 1979.** Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. *Plant Physiology* **64**: 1074-1077.
174. **Zažímalová E, Napier RM. 2003.** Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Reports* **21**: 625-634.
175. **Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L. 1999.** Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* **209**: 1-12.
176. **Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E. 2000.** Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* **210**: 302-311.