**Univerzita Karlova v Praze**
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Anatomie a morfologie rostlin
Studijní obor: Anatomie a fyziologie rostlin



**Zuzana Lenochová**

# Charakteristika programované buněčné smrti při vzniku lyzigenního aerenchymu
# Characterization of programmed cell death during lyzigenous aerenchyma formation

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitelka:
RNDr. Olga Votrubová, CSc.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31. 5. 2012

Zuzana Lenochová

**Finanční zajištění práce:**

Práce byla finančně podpořena grantem Centrum základního výzkumu č. LC06034.

**MOTTO:**

O švédském spisovateli Augustu Strindbergovi se dočteme, že byl přistižen, jak vyfukuje kouř z dýmky do umyvadla s vodou, zkoušeje, zda touto cestou nevznikne zlato. (...)
Nebyl to Strindberg, kdo experimentálně zjistil, že vypouštěním tabákového dýmu do vody zlato nevznikne?

(Cimrman, Smoljak, Svěrák; Vražda v salonním coupé, 1970).

**PODĚKOVÁNÍ:**

- Dr. Olze Votrubové za nedocenitelnou pomoc se psaním disertace, množství času, který věnovala jejímu vedení, nezdolnost, obdivuhodnou energii a vstřícnost, s níž ke mně vždy přistupovala.
- Mým rodičům, Pavlínce a babičce Evě, neboť především jim vděčím za motivaci k dokončení tohoto osmiletého tažení za třemi písmenky. Děkuji jim i za pochopení pro mou nepoužitelnost a zaneprázdněnost v posledních několika měsících.
- Honzovi za sedm neopakovatelných let.
- Dr. Andreji Kuthanové za konzultace, pomoc a přátelskou spolupráci.
- Dr. Aleši Soukupovi za odborné konzultace a přátelský přístup uplatňovaný mimo laboratoř.
- Mgr. Drahomíře Bartákové, nepostradatelné pro chod laboratoře.
- Dr. Jaroslavu Mervínskému za vstřícnost při udělování studijního volna.
- Kamarádkám a kamarádům za to, že je mám a je mi s nimi hezky, zvláště pak mému Arthuru Dentovi.
- Studentkám a studentům z Ječné a z GVP za pocit, že smysluplnou práci lze dělat i mimo laboratoř.
- Helence Š. a Tomášovi D. za ochotu pomoci, což oceňuji obzvláště ve sprintu posledních dní.

## POUŽITÉ ZKRATKY:

ACC = 1-aminocyclopropane-1-cyrboxylic acid
AO = akridinová oranž
AOA = aminooxy-acetic acid hydrochloride
AP = alkalická fosfatáza; reakce TUNEL-AP pozorovaná ve světlém poli nebo pod UV zářením
AP-fluo = reakce TUNEL-AP pozorovaná pod fluorescencí
ABA = abscisová kyselina
bp = pár bazí
BY-2 = buněčná suspenze *Nicotiana tabacum* L., cv. Bright Yellow 2
Cyt *c* = cytochrom *c*
DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole
DER = Epichlorohydrin-polyglycol epoxy resin
DMAE = 2-dimethylamino ethanol
DNA = deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EB = Evans blue, Evansova modř
EDTA = ethylen diamin tetraacetic acid, etylén diamin tetraoctová kyselina
ER = endoplazmatické retikulum
FAA = formaline-acetic acid-alcohol fixation, fixáž tvořená kyselinou mravenčí a formaldehydem
FDA = fluorescein diacetát
FITC = fluorescein isothiocyanát
GA = kyselina giberelová
GK = Golgiho komplex
HR = hypersenzitivní reakce
NR = neutral red, neutrální červeň
PBS = phosphate buffered saline, fosfátem pufrovaný solný roztok
PCD = programmed cell death, programovaná buněčná smrt
PCR = polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PI = propidium iodid
ROL = radial oxygen loss, únik kyslíku z kořenů
ROS = reactive osygen species, reaktivní formy kyslíku
SEs = sieve elements, sítkové elementy
TdT - terminal deoxynucleotidyltransferáza
TE = tris EDTA
TEM = transmisní elektronová mikroskopie
TEs = tracheary elements, cévní elementy
TMR – tetra- methylrhodamin
TUNEL = terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick-end labeling

**OBSAH:**

Abstrakt.....1

Abstract.....2

Úvod do problematiky.....3

Cíle práce.....5

Literární úvod.....6

Materiál a metody.....40

Výsledky.....51

Diskuse.....93

Shrnutí.....120

Seznam publikací.....123

Použitá literatura.....124

## ABSTRAKT:

Kukuřice setá je v literatuře označována jako rostlina s indukovanou tvorbou lyzigenního aerenchymu. Degradace některých kortikálních buněk je zahájena působením vnějšího spouštěče, většinou ve formě stresového působení (zaplavení aj.). Proces, kterým kortikální buňky umírají, vykazuje znaky charakteristické pro programovanou buněčnou smrt, jakými jsou fragmentace jaderné DNA nebo ultrastrukturní změny apoptotického rázu.
V primárních kořenech třinácti sledovaných kultivarů kukuřice byl přítomen aerenchym bez ohledu na kultivační podmínky. Plocha aerenchymu korelovala s délkou kořene, nikoli s jeho stářím. Pomocí inhibitoru syntézy etylénu (AOA) byla potvrzena závislost vzniku aerenchymu na přítomnosti tohoto fytohormonu. Bylo zjištěno, že tvorba aerenchymatických kanálů je ovlivněna světelnými podmínkami a vytvořené lyzigenní interceluláry kolokalizují s místy, kde se vyskytují buňky s charakteristicky fragmentovanou jadernou DNA (TUNEL-pozitivní jádra).
Během experimentů s TUNEL reakcí bylo nutné pro daný rostlinný materiál nově nalézt optimální ředění enzymatické směsi. Jako relevantní byl u použitých ručních řezů považován pouze výsledek pozorování povrchových vrstev, a to jak u směsi TUNEL-TMR, tak především u TUNEL-AP, jejíž penetrabilita je nižší. Výhodou varianty „AP“ bylo pozorování vzorků pod UV zářením, kdy fluorescence TUNEL-pozitivních jader (na rozdíl od jader ostatních) byla překryta černým produktem reakce alkalické fosfatázy.
Za účelem identifikace oblastí primární kůry, v nichž buňky začínají odumírat, byly kromě uvedené TUNEL reakce aplikovány postupy běžně užívané pro zjišťování buněčné viability. Použití neutrální červeně se však ukázalo pro pokročile diferencované pletivo kukuřičných primárních kořenů jako nevhodné. Při barvení pomocí Evansovy modři bylo možné v lokalizaci obarvených buněk pozorovat určité trendy (blízkost již vytvořených aerenchymatických kanálů, oblasti přilehlé k prorážejícím kořenům nebo nově vznikající primordia). Podobná lokalizace, rozšířená o oblast vodivých pletiv ve středním válci, pak byla pozorována i u buněk barvených fluorescenčními barvivy (PI, FDA, SYTOX, AO).
Na základě uvedených pozorování, srovnání s dříve získanými výsledky TEM a podobnosti s procesy během vzniku TEs, popsanými v literatuře, byl navržen pravděpodobný sled dějů v průběhu PCD kortikálních buněk vedoucí ke vzniku lyzigenního aerenchymu takto:
V buňkách určených k autolýze se objevují kulovité váčky obsahující esterázy. Tyto váčky mohou být obdobou ricinosomů cíleně transportujících esterázy např. k vakuole nebo k buněčným stěnám, kde jsou později využity pro degradační procesy. Následně je porušena integrita tonoplastu, centrální vakuola se smršťuje nebo rozpadá na vakuoly menší. Cytoplazma se mísí s vakuolární šťávou, snižuje se její pH. Nakonec je porušena i plazmatická membrána, která ztrácí svou selektivitu, celý protoplast kolabuje, tvoří se menší plazmalemou ohraničené váčky, v nichž se rozkládají fragmenty protoplastu s organelami včetně jádra. V závěru jsou rozloženy buněčné stěny.
Průběh PCD v kortikálních buňkách studovaných mokřadních rostlin se výše popsaným procesům u kukuřice v mnoha ohledech podobá. Patří mezi ně fragmentace jaderné DNA, tvorba váčků obsahujících aktivní esterázy a vyznačujících se nízkým pH, porušení tonoplastu, mísení cytoplazmy s buněčnou šťávou a změny permeability plazmatické membrány. Buňky, v nichž se tyto procesy odehrávají, jsou lokalizovány v blízkosti prorážejících primordií, v idioblastech a v oblasti budoucího lyzigenního aerenchymu. Jejich uspořádání koreluje se symplastickým propojením popisovaným v literatuře.

## ABSTRACT:

*Zea mays* is generally considered to be a plant with inducible lysigenous aerenchyma formation. The degradation of some cortical cells is triggered by environmental conditions, usually in the form of stress (submergence etc.). These cells die in a process that shows signs characteristic for programmed cell death, such as nuclear DNA fragmentation or apoptotic ultrastructural alterations.

Aerenchyma formed in primary roots of thirteen examined maize accessions, irrespective of cultivation conditions. The aerenchyma fraction correlated with the root length, not with its age. The dependence of aerenchyma formation on the presence of this phytohormone was proved by using an inhibitor of ethylene synthesis (AOA). It was found out that the aerenchyma formation depended on light conditions and that the lysigenous intercellulars intercellular spaces colocalized with areas with cells with characteristically fragmented nuclear DNA (TUNEL-positive nuclei).

In experiments using the TUNEL reaction it was necessary to determine new dilution of the enzymatic mixture for the examined plant material. Only the observation of surface planes of free-hand root sections was considered relevant in both TUNEL-TMR and TUNEL-AP assays. TUNEL-AP was evaluated as a mixture with a worse penetrability. However, it (treatment "AP") could be observed under UV radiation without a risk of false positives caused by the autofluorescence of TUNEL-negative nuclei, which was (unlike the fluorescence of other nuclei) covered with a black product of the reaction of the alkaline phosphatase).

In addition to the TUNEL reaction, other procedures, generally used as cell viability methods, were applied to identify the cortical regions in which the cells started to die. The application of neutral red turned out to be rather unsuitable for the highly differentiated tissue of plant roots. The Evans blue labelled cells are prone to occur in some parts of the cortex – primarily in the vicinity of preformed aerenchyma channels, areas surrounding the protruding root primordia and in these newly emerging roots themselves.

Similarly localized, enhanced by the vascular tissue in the central cylinder, were cells labelled with fluorescent probes (PI, FDA, SYTOX, AO).

Based on the observations described, comparison with former results of TEM and the resemblance of these data with events accompanying differentiation of TEs known from literature, a putative sequence of events occurring during PCD in maize cortical cells during lysigenous aerenchyma formation was proposed:

In the cells designed for autolysis spherical vesicles containing esterases appear. These vesicles might be analogy of ricinosomes, transporting their contents to special targets, e.g. to the vacuole or cell walls, where they are later used for degradation processes. Later, the tonoplast loses its integrity and the central vacuole shrinks or breaks into several smaller vacuoles. The cytoplasm mixes with the cell sap and its pH decreases. Finally, the plasma membrane ruptures, the whole protoplast collapses and smaller plasmalemma bound vesicles form, in which the protoplast fragments with organelles including the nucleus are digested. The process is terminated with the cell walls disintegrating.

The course of PCD in cortical cells studied in wetland plants with lysigenous type of aerenchyma resembles processes described in the roots of maize in many respects, including nuclear DNA fragmentation, formation of vesicles with low pH containing esterases, tonoplast rupture, blending of cytoplasm and vacuolar contents and changes of plasmalemma permeability. Cells in which these changes take place are localized in the vicinity of emerging primordia, in idioblasts and in positions of future lysigenous aerenchyma. Their pattern corresponds to the symplastic connections described in literature.

# 1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY A CÍLE PRÁCE

## 1.1 ÚVOD

Předkládaná disertační práce metodicky a tématicky navazuje na diplomovou práci (Lenochová 2004), která se zabývala výskytem a průběhem PCD v kořenech kukuřice seté při tvorbě aerenchymu. Tuto problematiku za pomoci TUNEL reakce a transmisní elektronové mikroskopie studovali (Gunawardena et al. 2001), kteří při vzniku aerenchymu indukovaného sníženou hladinou rhizosféristého kyslíku nebo působením etylénu prokázali přítomnost specifického štěpení DNA (u varianty ošetřené etylénem též pomocí DNA elektroforézy a apoptotických žebříčků) a ultrastrukturní změny charakteristické pro průběh apoptózy. Tyto výsledky byly ověřovány v uvedené diplomové práci pomocí TUNEL-reakce, TEM a DNA elektroforézy na jiném kultivaru kukuřice seté (CE 240). Rostliny byly pěstovány v normoxické a hypoxické hydroponii, byla naznačena souvislost mezi lokalizací TUNEL-pozitivních jader a aerenchymatickými kanály a kvantitativně byl vyjádřen rozdíl mezi rozsahem tvorby aerenchymu v provzdušňovaném a neprovzdušňovaném médiu. Zatímco zastoupení TUNEL-pozitivních jader i nepřesvědčivé výsledky DNA elektroforézy sledovaného heterogenního materiálu byly v souladu s původní prací, vznik aerenchymu nebyl pozorován pouze v hypoxické variantě, nýbrž i ve variantě kontrolní. Rovněž výsledky studia ultrastrukturních změn se poněkud lišily, hlavním rozdílem bylo pravděpodobné časné porušení tonoplastu, mísení buněčné šťávy s cytoplazmou a vznik jednoho či více váčků ohraničených plazmatickou membránou, v nichž pak byly degradovány cytoplazma a organely.

Výsledky diplomové práce dále rozvíjí předkládaná disertační práce. Prvním cílem bylo ověřit, zda v daném kultivaru kukuřice seté vzniká aerenchym skutečně bez ohledu na kultivační podmínky, a chování tohoto kultivaru experimentálně srovnat s jinými genotypy. Dále měla být pomocí inhibitoru tvorby etylénu potvrzena závislost tvorby aerenchymu na tomto fytohormonu, jenž je považován za významný prvek kaskády vedoucí k tvorbě aerenchymatických kanálů (Peng et al. 2001;He et al. 1996). Dalším krokem byla snaha o precizní korelaci vzniku aerenchymu s lokalizací buněk vykazujících fyziologické a anatomické změny a identifikace částí primární kůry, kde buňky odumírají nejdříve, podobně, jako se to podařilo např. u rýže (Kawai et al. 1998). Pro studium vlastního průběhu PCD byly hledány další metody zaměřené na změny plazmatické membrány, tonoplastu, DNA, enzymatickou aktivitu charakteristickou pro živé buňky aj. (Kawai et al. 1998;Obara et al.

2001;Johnson et al. 2010). Takto charakterizovaný lyzigenní aerenchym měl být následně srovnán s lyzigenním aerenchymem u mokřadních rostlin, u nichž je jeho tvorba konstitutivní. Jako zástupci takových rostlin byly zvoleny ostřice úzkolistá (*Carex gracilis*), rákos obecný (*Phragmites australis*), voďanka žabí (*Hydrocharis morsus ranae*) a rýže setá (*Oryza sativa*). U těchto rostlin bylo kromě vnitrobuněčných změn sledováno i to, zda rozložení umírajících buněk v primární kůře odpovídá výslednému uspořádání aerenchymu – u ostřice a rákosu paprsčitě (Seago et al. 2005;Soukup et al. 2002), u voďanky a rýže v přesně definovaných pozicích (Seago et al. 1999;Kawai et al. 1998). Jako rostlina, u níž aerenchym sice vzniká, ale nevede k tomu buněčná smrt, nýbrž diferencovaný rozvoj kortikálních buněk, byl zvolen puškvorec obecný (*Acorus calamus*), (Soukup et al. 2005).

V průběhu experimentů vedených za účelem dosažení výše popsaných cílů vyvstala nutnost optimalizace některých metod a provedení dalších pokusů.

Bylo třeba pozměnit metodiku TUNEL reakce, která, ač dříve osvědčená (Lenochová et al. 2004;Kuthanova et al. 2008a), začala dávat nekonzistentní výsledky. Za tímto účelem byly aplikovány dva různé TUNEL kity a bylo vyzkoušeno několik variant postupů.

Během kultivací kukuřice zaměřených na sledování vlivu etylénu za využití tzv. „tripple response“ pomocí naklíčených rostlin hrachu (Arshad and Frankenberger 1988) byla zjištěna souvislost mezi tvorbou aerenchymu a různými světelnými podmínkami, což vedlo k dalším pozorováním zaměřeným na tuto problematiku.

V oblasti vnitrobuněčných změn spojených s PCD, zvláště při použití TUNEL reakce, čerpala předkládaná disertace ze spolupráce s pracovní skupinou prof. Zdeňka Opatrného (Kuthanova et al. 2008a;Kuthanova et al. 2008b;Kuthanova et al. 2004), při studiu anatomie mokřadních rostlin vychází ze zázemí a zkušeností pracovní skupiny vedené RNDr. Olgou Votrubovou, CSc. a Alešem Soukupem, PhD (Soukup et al. 2002;Seago et al. 2005;Soukup et al. 2007;Steinbachova-Vojtiskova et al. 2006;Soukup et al. 2005).

## 1.2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem bylo popsat průběh programované buněčné smrti při vzniku indukovaného lyzigenního aerenchymu v kořenech kukuřice seté na vnitrobuněčné úrovni i v rámci primární kůry jako celku a porovnat tyto procesy s rostlinami charakterizovanými konstitutivní tvorbou lyzigenního aerenchymu.

**Dílčí cíle:**

1) Ověřit indukovatelnost tvorby aerenchymu u kukuřice – různé kultivary, různé kultivační podmínky
2) Indukovatelnost tvorby aerenchymu potvrdit závislostí na působení etylénu
3) Pomocí osvědčených metod indikujících PCD prokázat prostorovou souvislost takto zjištěných změn s tvorbou lyzigenního aerenchymu
4) V primární kůře lokalizovat místo, kde buňky začínají umírat, aby bylo možné sledovat postupný sled kroků provázejících tyto vnitrobuněčné změny
5) Pomocí dalších metod využitelných v kořeni jako heterogenním rostlinném pletivu přesněji popsat průběh PCD v kortikálních buňkách kukuřice při vzniku indukovaného lyzigenního aerenchymu, srovnat jej s průběhem PCD u rostlin s konstitutivním vznikem lyzigenního aerenchymu, navrhnout pravděpodobný sled vnitrobuněčných změn při PCD probíhající při vzniku lyzigenního aerenchymu

# LITERÁRNÍ ÚVOD

## 2.1 Typy buněčné smrti

Programovaná buněčná smrt, jež je hlavním tématem předkládané dizertační práce, není jediným způsobem, kterým může buňka skončit svůj život. V současné době jsou typy buněčné smrti u živočichů i u rostlin děleny do tří kategorií. U živočichů se rozlišuje mezi apoptózou, autofagií a nekrózou. Apoptóza a autofagie jsou považovány za případy programované buněčné smrti (PCD), nekróza se projevuje jako nabobtnání buňky způsobené porušením integrity její plazmatické membrány a následované její rychlou a neřízenou smrtí, která nevyžaduje syntézu zvláštních látek nebo energii. Masivní nekróza ischemické nebo patogeny napadené živočišné tkáně může pak mít pro organizmus fatální následky, neboť odumírající buňky neinformují zavčasu specializované fagocyty a nestíhají být bezpečně zlikvidovány, což v lepším případě končí odhojením nekrotické tkáně, v horším případě pak gangrénou (Havel 1996;Reape et al. 2008). Uvedená klasifikace může být považována za zjednodušenou, jak uvádí Proskuryakov et al. (2003). Autoři hovoří o několika typech nekrózy, od nekrózy velmi rychlé, odehrávající se v reakci na akutní stresové působení, po nekrózu pozvolnou a výrazně regulovanou.

Dříve se pro některé typy PCD používal pojem „lyzosomálně-degenerativní buněčná smrt“, avšak v současné literatuře se tento termín již běžně nevyskytuje (Jones 2000;Reape et al. 2008).

O programované buněčné smrti obecně lze říci, že se jedná o proces řízený organismem, jehož je buňka součástí. Může se jednat buď o proces, který je nutný pro jeho normální vývoj (např. eliminace buněk mezi budoucími prsty lidského plodu), nebo o proces vyvolaný změnou vnějších či vnitřních podmínek, ať už jde o stres způsobený snížením dostupnosti životně nutných látek nebo o sebevraždu, již např. v lidském organismu spáchá nakažená či poškozená buňka poté, co byla rozpoznána složkami imunitního systému v podobě cytotoxického T-lymfocytu nebo NK buňky (Pennel and Lamb 1997).

## 2.2 Programovaná buněčná smrt u živočichů

Autofagie nebo autofagická buněčná smrt je charakterizována zachováním cytoskeletárního aparátu až do pozdních fází celého procesu, během kterého se tvoří větší množství lyzosomů a v nich dochází k degradaci jednotlivých buněčných organel. Úskalím při popisování tohoto typu PCD je skutečnost, že podobně se projevují i buňky, které „nehodlají“ skoncovat se

životem, ale podstupují běžný organelový „turn over“, tedy degradaci starých a poškozených organel. Je tedy třeba vytrvat v pozorování a proces za autofagii („sebepohlcování“, lat.) označit až ve chvíli, kdy je skutečně zakončen buněčnou smrtí. Tímto způsobem odumírají např. buňky při metamorfóze u lišaje *Manduca sexta* nebo při hladovění buněk *Dictyostelium discoideum* (Bursch et al. 2000;Reape et al. 2008). U *D. discoideum* (Kosta et al. 2004) experimentálně vyřadili z funkce jeden z genů zapojených do tvorby autofagických tělísek, avšak na buňky působili podmínkami, které PCD u tohoto organismu spouštějí (hladovění a ošetření morfogenem DIF, differentiation inducing factor, jenž si většina kmenů tohoto organismu při hladovění tvoří sama, ale právě zkoumaná kultura to nedokáže). K překvapení autorů se i tyto buňky jaly programovaně umírat, ač bez přítomnosti autofagosomů, procesem, který dosud nebyl popsán, lišil se od nekrózy i apoptózy a zahrnoval kondenzaci cytoplazmy a organel v centru buňky, zatímco v jejích periferiích byla zjištěna kumulace F-aktinu. Buňky zůstávaly po dlouhou dobu kulaté a až v posledních fázích celého procesu mírně nabobtnaly a jejich plazmatická membrána praskla. Autoři na základě těchto zjištění připouštějí, že vznik autofagosomů a vakuolizace nemusejí být příčinou a nutnou součástí, ale pouze průvodním jevem PCD u hladovějících buněk *D. discoideum*. Jako druhé vysvětlení vyslovují hypotézu o dvou možných cestách vedoucích v témže organismu k PCD, přičemž běžnější je proces zahrnující vakuolizaci jako nástroj PCD. Je-li však tomuto ději nějakým způsobem zabráněno, je *D. discoideum* schopné spáchat sebevraždu alternativní cestou.

Apoptóza je nejčastěji popisovaným typem PCD známým již mnoho desítek let. Její název je odvozen od řeckého slova *apoptosis*, což je označení používané pro opad listů nebo květních plátků. Poněkud paradoxně se však toto označení vžilo pro konkrétní typ buněčné smrti, kterému podléhají živočišné, nikoli rostlinné buňky (Havel 1996). U rostlin bývá používáno označení „apoptosis-like PCD“, což bychom do češtiny mohli přeložit třeba jako PCD podobná apoptóze. Jako taková pak vykazuje některé známky typické pro apoptózu (Reape et al. 2008).

Typická apoptóza začíná smrštěním cytoplazmy a chromatinu, který je natěsnán k jadernému obalu (tzv. pyknotický chromatin), pokračuje přes ztrátu asymetrie plazmatické membrány provázenou vystavením fosfatidylserinu na jejím povrchu, následuje tzv. zeiotické zvlnění jaderné a plazmatické membrány a specifické naštípání DNA. Zakončena je pak tvorbou tzv. apoptotických tělísek, na která se rozpadne celý buněčný obsah a která jsou pak pohlcena a degradována okolními buňkami (Beers 1997;Danon et al. 2000;Cohen 1993;Pennel and Lamb 1997).

První fáze apoptózy jsou pozorovatelné především prostřednictvím elektronové mikroskopie (Kerr et al. 1972;Pennel and Lamb 1997;Cohen 1993), pro detekci ztráty asymetrie plazmatické membrány bývá využíván annexin V, člen skupiny multifunkčích živočišných i rostlinných proteinů, vážící se preferenčně k negativně nabitým fosfolipidům (Danon et al. 2000;Mortimer et al. 2008).

Další z projevů apoptózy, typické štěpení jaderné DNA neboli DNA processing, je při studiu tohoto typu PCD znakem hojně využívaným. Jedná se o tvorbu dvouřetězcových zlomů v oblasti mezi nukleosomy, díky kterým vznikají úseky o délce 180 párů bází nebo jejich násobků (Kerr et al. 1972). Za tuto fragmentaci, které alespoň v některých případech předchází štěpení na vyšší organizační úrovni v oblasti histonu H1 (Bortner et al. 1995), nese odpovědnost mimo jiné endonukleáza NUC 18 (Bortner et al. 1995), tzv. "DNA Fragmentation Factor 40 (DFF40)" neboli "Caspase-activated DNase (CAD)" (Widlak 2000) a asi třicet dalších endonukleáz, jež v průběhu života buňky zastávají jiné funkce (Aleksandrushkina and Vanyushin 2009).

Mezi metody nejčastěji používané pro detekci uvedených zlomů patří DNA elektroforéza a TUNEL reakce (viz dále), z méně specifických jmenujme využití fluorescenčního značení pomocí akridinové oranže (viz dále, Bortner et al. 1995;Gavrieli et al. 1992;Kelly et al. 2003;Kuriyama 1999;Anonymous 2009).

Přestože je vznik fragmentů DNA jedním z nejčastěji používaných znaků pro detekci apoptózy, můžeme se s tímto jevem setkat i při nekróze některých buněk (Dong et al. 1997), případně se může jednat o artefakt způsobený chemickým nebo dokonce mechanickým působením na sledované vzorky (Taatjes et al. 2008;Anonymous 2006).

Díky molekulárně-biologickým metodám byla identifikována řada genů aktivovaných v souvislosti s nástupem a průběhem apoptózy, díky čemuž je zpětně možné těchto genů nebo jejich produktů využít pro detekci procesů spojených s apoptózou. Pro zahájení apoptózy v některém z kontrolních bodů buněčného cyklu hraje v buňce s poškozením DNA klíčovou roli např. protein p53, který se účastní spuštění signální kaskády vedoucí k apoptóze. Jeho syntéza nebo funkčnost je limitována asi v 70 % rakovinných buněk, tedy buněk, které nejsou schopny programovanou buněčnou smrt podstoupit (Evan et al. 1995;Whibley et al. 2009).

Řadu úloh spojených s indukcí a průběhem apoptózy zastávají cysteinové proteázy, označované jako kaspázy (caspases, cystein aspartases), dříve jako ICE-proteasy (isoleukin-1-beta converting enzymes). Jedná se o vysoce specifické enzymy vyžadující v substrátu přesně danou sekvenci nejméně 4 aminokyselin a štěpící daný peptid za aspartátem. Dělí se do tří skupin (kaspázy spouštějící apoptózu, kaspázy účastnící se průběhu apoptózy a cytokinové

zánětlivé kaspázy), vyznačují se typickou kvartérní strukturou a jsou zahrnuty jak do průběhu apoptózy, tak i autofagické buněčné smrti živočišných buněk, i když byly zaznamenány i na kaspázách nezávislé případy obou těchto procesů (Chaloupka 1999;Hengartner 2000;Grutter 2000;Bonneau et al. 2008).

Dalším významným hráčem v procesu apoptózy je mitochondrie, která se uplatňuje nejen coby organela klíčová pro katabolické buněčné děje, ale také jako místo, kde se protínají signální proapoptotické i protiapoptotické dráhy přicházející od jádra i od receptorů na plazmatické membráně, tedy dráhy reagující na situaci vnitrobuněčnou i vnější. Látkami, které přímo interagují s mitochondrií, jsou proteiny z rodiny Bcl-2, které se vyskytují jednak volně v cytoplazmě, jednak na některých intracelulárních membránách. Patří mezi ně jak proteiny s funkcí proapoptotickou (např. Bim, Bid, Bax), tak proteiny k nim antagonistické (Bcl –2 *sensu stricto*, Bcl-$x_L$). Poté, co jsou tyto proteiny aktivovány, naváží se na membránu mitochondrie a z této organely jsou potom uvolněny další látky, např. cytochrom *c*. Zatímco ve fázi „předmitochondriální“ se uplatňuje v signálních drahách např. kaspáza-8, po uvolnění cytochromu *c* se dostává ke slovu kaspáza-9, součást tzv. apoptosomu, jímž je následně aktivována kaspáza-3, patřící již k efektorovým apoptotickým kaspázám (Bonneau et al. 2008;Becker et al. 2002;Hengartner 2000).

## 2.3 Programovaná buněčná smrt u rostlin

### Srovnání rostlinné a živočišné PCD

Jak již bylo uvedeno výše, případy buněčné smrti u rostlin lze rovněž rozdělit do tří kategorií. První z nich je opět neřízená (nebo mírně usměrňovaná) nekróza, případy programované buněčné smrti je možno zařadit do kategorie autofagie nebo apoptóze podobné buněčné smrti (Takatsuka et al. 2004).

I přes tuto snahu o kategorizaci je zřejmé, že se různé případy rostlinné PCD od sebe mohou výrazně lišit, a to od samého začátku, přes to, jak probíhají, až po jejich zakončení. Indukovány mohou být vývojově i vnějšími podmínkami, např. stresem v podobě zaplavení. Celý děj může trvat několik minut (např. v případě nutně rychlé hypersenzitivní reakce), ale i celé dny (příkladem je senescence, při níž jsou ze stárnoucích orgánů stahovány do ostatních částí rostliny ještě využitelné látky). Odumírající buňky mohou být následně odstraněny během opadu orgánu, jehož součást tvoří, mohou být zcela rozloženy a jejich zbytky odbourány nebo stlačeny okolními buňkami, ale mohou i do jisté míry přetrvávat na původním místě, jako je tomu při vzniku cévních elementů (Gietl and Schmid 2001;Beers and McDowell 2001).

Autofagická PCD se uplatňuje v mnoha případech řízené likvidace rostlinných buněk. Hlavním aktérem tohoto procesu je vakuola a v ní obsažené hydrolytické enzymy, které se po porušení tonoplastu vylijí do cytosolu a jejich přičiněním dochází k rozkladu organel a látek v cytoplazmě obsažených. Jako autofagická PCD je označován i proces provázený tvorbou drobných vakuol, do nichž jsou přesouvány organely a cytoplazma. Obsah těchto tzv. autolyzosomů nebo autofagosomů je opět rozložen hydrolytickými enzymy (Takatsuka et al. 2004).

Jak sám název napovídá, apoptóze podobná buněčná smrt je charakterizována jevy popsanými výše v sekci věnované apoptóze. V tomto procesu lze pozorovat jak ultrastrukturní změny a fragmentaci DNA doprovázenou tvorbou apoptotického žebříčku (např. v senescentních květních obalech, v buňkách tabákové kultury BY-2 stresované chladem či ionty kadmia nebo při tzv. hypersenzitivní reakci, viz dále), tak identifikovat znaky molekulárního charakteru, kterými jsou různé složky signálních kaskád či řetězců enzymatických reakcí vykonávajících rozklad buněčného obsahu. Je však běžné, že se v případě rostlinných pletiv uplatňují jen některé z uvedených znaků (Danon et al. 2000;Koukalova et al. 1997;Fojtova and Kovarik 2000).

Pomocí elektronové či světelné mikroskopie byly pozorovány anatomické změny na buněčné a intracelulární úrovni, jakými jsou scvrknutí protoplastu doprovázené oddělením plazmalemy od buněčných stěn, zvlnění jaderné membrány, kondenzace chromatinu a dokonce i vznik útvarů, které lze přirovnat k apoptotickým tělískům. Tato tělíska však nejsou v závěru pohlcena okolními buňkami, ale o jejich odbourání se stará buňka sama. Důvodem je jak absence mobilních fagocytů, tak přítomnost pro rostlinné buňky typické pevné buněčné stěny (Gunawardena et al. 2001a;Gietl and Schmid 2001). V případě buněčné tabákové suspenze vystavené působení kamptotecinu byla pozorována i ztráta symetrie plazmatické mebrány (Danon et al. 2000).

Zatímco funkce kaspáz je typická pro široké spektrum případů živočišné apoptózy, v žádném rostlinném pletivu podstupujícím apoptóze podobnou PCD nebyla činnost těchto enzymů prokázána. V mnoha rostlinných pletivech byly sice indentifikovány geny sekvenčně vysoce homologické s kaspázami, kódující enzymy typu proteáz, nicméně se o kaspázy ani jejich funkční homology nejedná. Ač jsou tyto geny někdy exprimovány v souvislosti s nastupující či probíhající PCD, nejsou uvedené enzymy schopné štěpit látky, které jsou substrátem kaspáz, a zároveň jejich funkce není blokována kaspázovými inhibitory. Předpokládá se tedy, že mohou hrát jinou roli v signálních nebo regulačních kaskádách některých typů rostlinné PCD. Oproti tomu bylo nalezeno několik proteáz, které reagují se substráty různých kaspáz

(např. kaspázy-1, kaspázy-6) nebo podléhají inhibici kaspázovými inhibitory (např. inhibitorem kaspázy-3). Jejich aktivita se projevuje v cytosolu, vakuole nebo jádře. Jedná se např. o rostlinný enzym VPE (vacuolar processing enzyme), někdy označovaný jako YVADáza (štěpí YVAD, substrát kaspázy-1), nebo tzv. saspázu (serinová proteáza s aspartátovou specifitou), která reaguje se substrátem pro kaspázu-6 a kaspázu-1 a podléhá kaspázovým inhibitorům. Lokalizována je jak v cytosolu, tak mnohdy i extracelulárně, což by mohlo naznačovat, že zastává funkci signálu v raných fázích spouštění PCD. Bylo prokázáno, že enzym VPE je klíčový pro zahájení PCD u virově indukované hypersenzitivní reakce rostlin *Nicotiana tabacum*, zatímco bakteriální infekce u *Arabidopsis thaliana* je zodpovědná za zapojení proteasomu s aktivitou kaspázy 3, které vyvolá spojení tonoplastu s plazmalemou a vyplavování proteolytických antibakteriálních enzymů do mezibuněčných prostor. K cytoplazmatickým enzymům lze zařadit i enzym z ječné buněčné kultury se shodnou aktivitou jako má kaspáza-3. Z dosud získaných dat vyplývá, že rostliny obsahují enzymy podobné funkce, jakou v živočišných tkáních zastávají kaspázy, ale jejich vlastnosti se zcela neshodují a jedná se tedy pravděpodobně o složitě provázanou proteázovou síť (Hoeberichts and Woltering 2002;del Pozo and Lam 1998;Korthout et al. 2000;Suarez et al. 2004;Bonneau et al. 2008;Hatsugai et al. 2004;Hatsugai et al. 2006;Hatsugai and Hara-Nishimura 2010).

V poslední době bylo popsáno mnoho případů živočišných PCD na kaspázách nezávislých, v jejichž spouštěcím mechanismu by mohly hrát roli podobné cesty jako v rostlinných pletivech (např. proces označovaný jako onkóza). Vnější mitochondriální membrána zde reaguje např. na působení ROS (reaktivní kyslíkaté sloučeniny) nebo na vtok vápenatých iontů, otevírá v sobě specifické kanály a do cytoplazmy se uvolňuje cytochrom *c*. Byl prokázán vliv exogenního cytochromu *c* na spuštění PCD, avšak přítomnost proteinů z rodiny Bcl-2 zde potvrzena nebyla, nalezeny byly pouze proteiny jim sekvenčně blízké, stejně jako inhibitory proteinů Bcl-2 (Hoeberichts and Woltering 2002;Chipuk and Green 2005;Reape et al. 2008;Jones 2000).

Za obdobu kaspáz v některých případech rostlinné PCD (např. sensescence nucelu v semeni skočce, degradace pletiva při otevírání prašníků, opad okvětí u denivky) mohou být považovány cysteinové endopeptidázy s C-koncovou sekvencí KDEL, které se vyskytují v rostlinně specifických organelách označovaných jako ricinosomy. Tyto organely (původně popsané jako organely unikátní pro endosperm skočce *Ricinus communis*) vznikají jako deriváty endoplazmatického retikula, jsou posety ribosomy a enzymy se v nich vyskytují jak v neaktivní, tak aktivní formě, ve které jsou pak uvolňovány do cytoplazmy (Gietl and

Schmid 2001;Schmid et al. 1999;Schmid et al. 2001;Mollenhauer and Totten 1970;Greenwood et al. 2005;Senatore et al. 2009).

Výše uvedené ROS hrají v rostlinných buňkách dvojí roli. Jednak jsou tyto radikály, způsobující oxidativní stres, produkovány mitochondriemi, chloroplasty a dalšími organelami jako běžný vedlejší produkt jejich činnosti, jednak jsou uvolňovány v reakci na stres. Jako takové mohou působit jako obrana proti patogenům, ale zároveň, je-li stresové působení příliš silné, mohou být i spouštěčem kaskády vedoucí k PCD (Jones 2000). Typickým příkladem ROS je např. $H_2O_2$ nebo $O_2^-$ (vznikající spojením kyslíku a elektronů nahromaděných v dýchacím řetězci v komplexu III), ale v signálních kaskádách spojených např. s hypersenzitivní reakcí (viz dále) se uplatňují i látky, které mezi ROS nebývají běžně řazeny, např. NO (Hoeberichts and Woltering 2002;Beers and McDowell 2001;Colmer and Voesenek 2009). Pro rostliny je typická přítomnost některé formy enzymu alternativní oxidázy (AOX), který se jednak účastní produkce tepla v rostlinných pletivech, jednak je jeho exprese zvýšena při nadprodukci ROS, které jsou jeho prostřednictvím následně odbourávány (Lam et al. 1999;Feng et al. 2010;Ito-Inaba et al. 2009). Tento enzym, lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně buněk rostlin, některých hub a prvoků, se uplatňuje např. při somatické embryogenezi *Abies alba*, kdy je během zrání embryí zvyšováno jeho množství, díky čemuž se naopak snižuje zastoupení buněk podléhajících PCD (Petrussa et al. 2009).

Dalším z článků zapojených alespoň v některých případech do signálních kaskád vedoucích k rostlinné PCD je vápník v podobě $Ca^{2+}$ (Pennel and Lamb 1997). Hromadění těchto iontů v cytoplazmě, doprovázené změnou napětí na mitochondriální membráně, bylo pozorováno např. u tabákových protoplastů vystavených působení NO, spouštějícímu PCD (Wang et al. 2010). U tabákových buněk BY-2 stresovaných přidáním D-erytrosfinganinu, vyvolávajícího apoptóze podobnou PCD, bylo detekováno nejen zvýšení koncentrace cytoplazmatického vápníku, ale s několikaminutovým odstupem i nárůst koncentrace vápenatých iontů v jádře (Lachaud et al. 2010). Zapojení tohoto prvku do signální kaskády vedoucí k PCD v rámci rostliny jako celku bylo dokumentováno pomocí rutheniové červeně, která blokuje vápníkové kanály, a to jak v případě PCD vyvolané změnami vnějších podmínek (zastavení vzniku lyzigenního aerenchymu v kořenech kukuřice pěstované v hypoxii, (He et al. 1996a), tak u vývojově řízené PCD (inhibice tvorby perforací v čepelích vodní rostliny *Aponogeton madagascariensis*, (Elliott and Gunawardena 2010).

Za povšimnutí stojí i výsledky některých studií zaměřených na demetylaci DNA. Vyplývá z nich, že v důsledku spuštění apoptotické kaskády jsou demetylací aktivovány některé geny spojené s nástupem senescence a smrti buňky, např. geny pro vznik celulázy a

polygalakturonázy, tj. enzymů zapojených do rozkladu buněčných stěn např. při zrání plodů (Vanyushin et al. 2004).

Dalšími, pro rostliny zcela specifickými činiteli ovlivňujícími osud jednotlivých buněk i celých pletiv, jsou fytohormony. Bylo prokázáno, že se tyto látky aktivně účastní i nástupu a regulace PCD. Popsána byla např. součinnost kyseliny salicylové a etylénu s $H_2O_2$, a to jak např. v buněčných kulturách BY-2, tak i v těmito látkami ošetřených rostlinách tabáku, uplatňují se rovněž přirozeně při hypersenzitivní reakci. Proapoptotický efekt vykazují dokonce i vyšší dávky cytokininů - fytohormonů, které se v rostlinách uplatňují spíše opačným způsobem, tedy inhibicí projevů stárnutí. V buněčné kultuře *Daucus carota* byl tento efekt blokován aplikací dalších fytohormonů, auxinu a kyseliny abscisové. Proti účinkům kyseliny abscisové, tedy proapoptoticky, naopak v některých případech působí aplikace giberelinů (Aleksandrushkina and Vanyushin 2009;Hoeberichts and Woltering 2002).

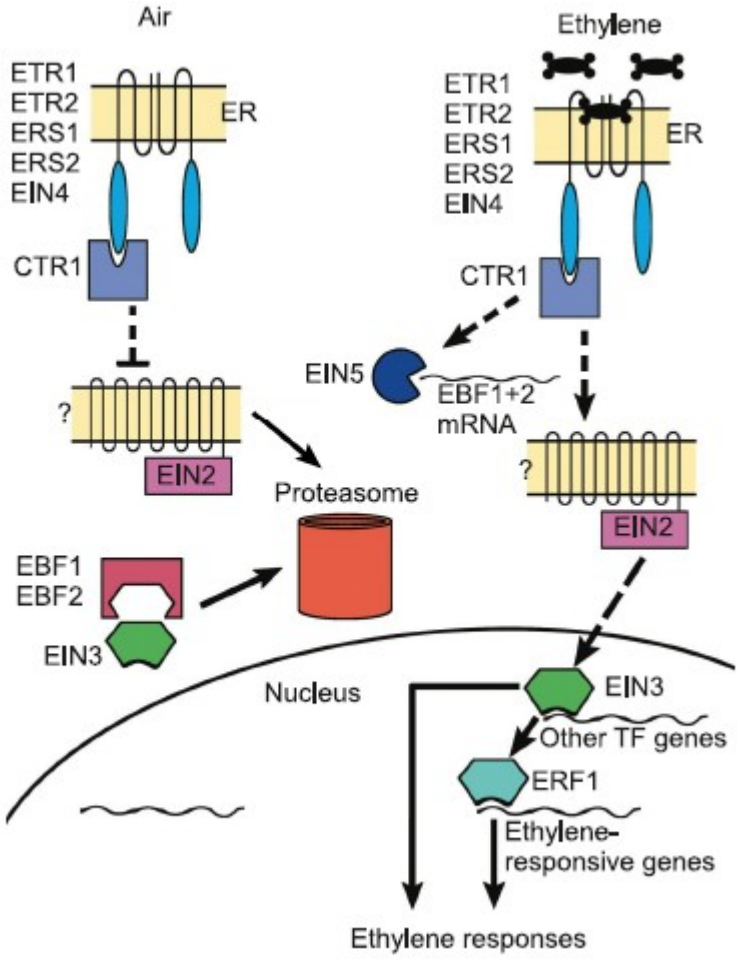
Zvýšená tvorba etylénu, jediného známého plynného fytohormonu, provází v podstatě všechny stresové situace působící na rostlinu. U některých rostlin spouští obrannou reakci po napadení patogeny (Bleecker and Kende 2000), v zaplavených rostlinách indukuje tvorbu adventivních kořenů, rychlý růst stonku ponořených rostlin snažících se dosáhnout ke vzduchu, nebo zvýšení syntézy enzymu alkohol dehydrogenázy, nezbytného pro dostatečně efektivní metabolické procesy v hypoxických podmínkách (Peng et al. 2001). Opakovaně bylo prokázáno, že v hypoxických podmínkách za přítomnosti etylénu vzniká v kořenech kukuřice aerenchym, zatímco při anoxii k tvorbě tohoto pletiva nedochází. Pravděpodobně je to právě důsledkem absence alespoň minimálního množství kyslíku, který je nutný pro přeměnu 1-aminocyklo-propan-1-karboxylové kyseliny (ACC) na etylén prostřednictvím ACC oxidázy (Brailsford et al. 1993;Drew et al. 2000;D´Abundo 2003;Ecker 1995;He et al. 1996a;Jackson et al. 1985).

Etylén, jehož působení vede často k rostlinné PCD, je součástí složité signální sítě (Stepanova and Alonso 2005;Ponce et al. 2005). Jejími dalšími prvky jsou alespoň v některých případech další fytohormony (gibereliny s etylénem spolupracují, zatímco cytokininy a ABA mají opačný účinek), výše zmíněné ionty $Ca^{2+}$ nebo ROS (nárůst cytosolické koncentrace těchto látek podporující nástup PCD ukazuje na jejich roli druhých poslů), ale někdy i G-proteiny či MAP-kinázová kaskáda. Prokázány byly i interakce s působením vnějších podmínek, mezi něž patří např. světlo. Závěrem takové signální kaskády je pak transkripce specifických genů nutných pro spuštění a průběh PCD, např. takových, podle nichž vznikají hydrolytické enzymy uplatňující se při rozpadu buněčných stěn při zrání plodů nebo enzymy zapojené do

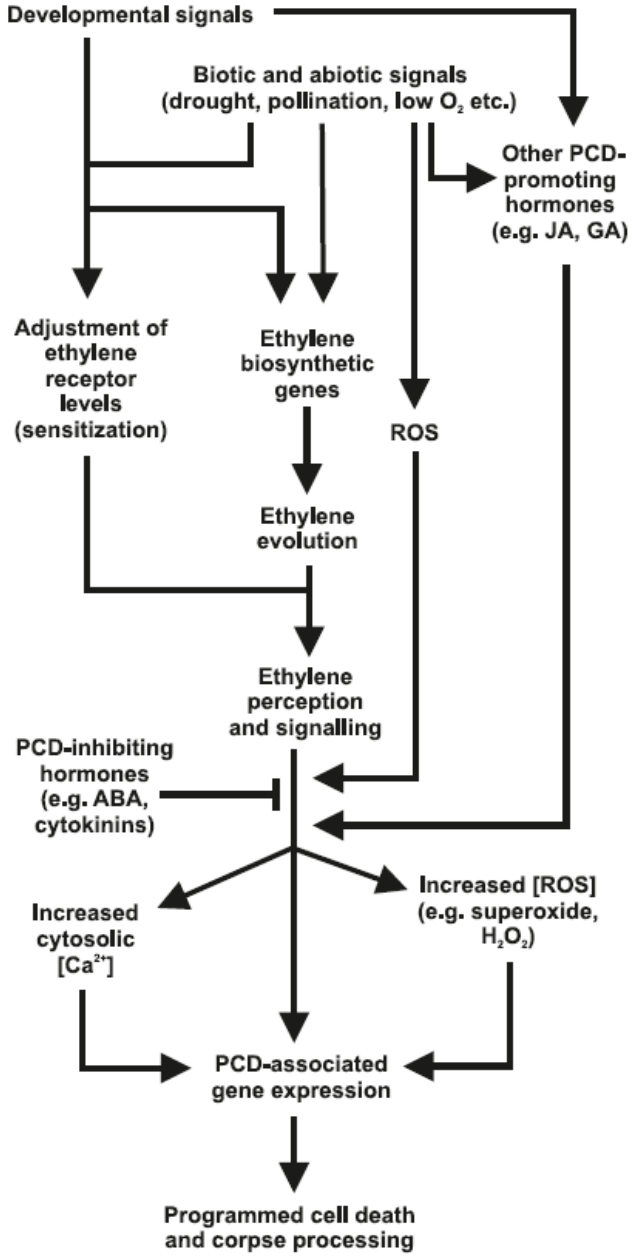
PCD při opadu listů či při reakci na poranění a působení patogenů (Bleecker and Kende 2000;Guo and Ecker 2004;Trobacher 2009).

Samotný etylén vzniká ve specializovaných buňkách a pletivech a odsud se šíří do okolí, přičemž reagovat na něj dokáží jen některé části rostliny, v extrémních případech jen konkrétní, od okolí zdánlivě ničím se nelišící buňky. Biosyntéza etylénu začíná konverzí methioninu na S-adenozylmethionin prostřednictvím AdoMet syntetázy. Působením ACC syntázy vzniká z této látky 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (ACC). Ta je pak díky ACC oxidáze přeměněna na etylén a kyanid, který je později detoxifikován. Zatímco krok, v němž vzniká ACC, je fází limitující rychlost tvorby etylénu, pro konečnou přeměnu ACC na etylén je pak nutný kyslík, což se ukazuje jako zásadní pro reakce rostlin vystavených zaplavení a působení anoxických podmínek.

Vinu na odlišných reakcích různých pletiv, která jsou vystavena působení etylénu, zřejmě nese např. přítomnost, množství a stav etylénových receptorů. U *Arabidopsis* je to rodina pěti genů, kam patří např. *ETR1*. Produkty těchto genů jsou transmembránové proteiny endoplazmatického retikula, jejichž funkce konstitutivně inhibuje reakce v podobě odpovědi na etylén. Až po navázání etylénu je z receptoru uvolněn protein CTR1 s kinázovou aktivitou, po čemž následuje aktivace proteinu EIN2 (začleněného do blíže neurčené membrány) a jeho působením aktivace v jádře lokalizovaného transkripčního faktoru EIN3. Poté přicházejí na řadu další transkripční faktory a v důsledku jejich činnosti pak exprese genů zapojených do odpovědi na působení etylénu (Trobacher 2009).




*Obr. 2.1. Model přenosu etylénového signálu. Není-li přítomen etylén (levá část schématu), blokuje etylénový receptor CTR1 aktivitu komplexu EIN2 lokalizovaného na membráně endoplazmatického retikula. Kromě toho je množství proteinu EIN2 udržováno na nízké úrovni činností proteasomu, podobně jako množství transkripčního faktoru EIN3, pro degradaci označeného proteiny EBF1 a EBF2. Naopak přítomnost etylénu (pravá část obrázku) a jeho navázání na receptor CTR1 aktivuje neznámým mechanismem (přerušovaná čára) protein EIN2 i transkripční faktory, např. EIN3, který pak aktivuje jednak sekundární transkripční faktory (např. ERF1), jednak sám zastává obdobnou roli jako ony, tedy spustí transkripci genů indukujících odpověď na etylén (Trobacher 2009).*




*Obr. 2.2. Obecný model kaskády vedoucí k PCD regulované etylénem. PCD může být způsobena jak vnitřními, tak vnějšími faktory v součinnosti s dalšími fytohormony. ROS mohou spustit PCD nezávisle na etylénu (např. při HR), ale mohou se uplatnit rovněž jako druhý posel v odpovědi na etylénový signál. Šipky a úsečky naznačují pozitivní a negativní regulační vztahy (Trobacher 2009).*

V posledních letech se ukazuje, že významným prvkem signálních kaskád vedoucích k rostlinné PCD je oxid dusnatý, NO. Tato látka se uplatňuje velkou měrou i u živočichů, kde se účastní např. změn na synaptických spojích, je zahrnuta v kaskádách, kde jsou činné MAP kinázy, ale je zapojena i do signálních sítí vedoucích k apoptóze nebo naopak apoptóze bránících, a to formou vazby na různé kaspázy. V některých z uvedených cest NO úzce spolupracuje s cyklickým guanozin-monofosfátem (cGMP).

NO v rostlinných buňkách vzniká buď neenzymaticky jako produkt reakcí $NO_x$ a metabolitů, rozkladu $N_2O$, redukce dusitanů nebo enzymaticky. Enzymy dávající vznik NO mohou být nitrát reduktáza (NR, enzym, který v anaerobních podmínkách redukuje $O_2$ na $O_2^-$, jenž je spolu s dalšími ROS zodpovědný za oxidativní poškození buňky) nebo rostlinný analog savčí NO syntázy (NOS-like protein, přítomný v různých buňkách v peroxisomech, chloroplastech, ale i v cytosolu). Signální role NO v rostlinných buňkách byla sledována při senescenci, HR (vznik díky aktivitě enzymů typických pro savčí makrofágy, NADPH oxidáza a NOS) nebo tvorbě TEs (viz dále). NO je pravděpodobně zapojen do více cest, z nichž jedna vede k inhibici syntézy etylénu, jiná ovlivňuje množství $Fe_2^+$ v buňce a tím zasahuje i do tzv.

Fentonovy reakce produkující hydroxylové radikály a tím přispívající k buněčné smrti, další využívá jako druhého posla výše uvedený cGMP, což poté ústí v aktivaci obranných genů při HR. NO může zřejmě díky svému redoxpotenciálu ovlivňovat i množství ROS v buňce, což se může projevit jako významný regulační prvek signálních kaskád (Wendehenne et al. 2001). Zásadní význam má zřejmě schopnost NO ovlivnit koncentraci $Ca^{2+}$, aktivitu kináz a přímou nitrosylací i aktivitu cílových proteinů (Courtois et al. 2008).

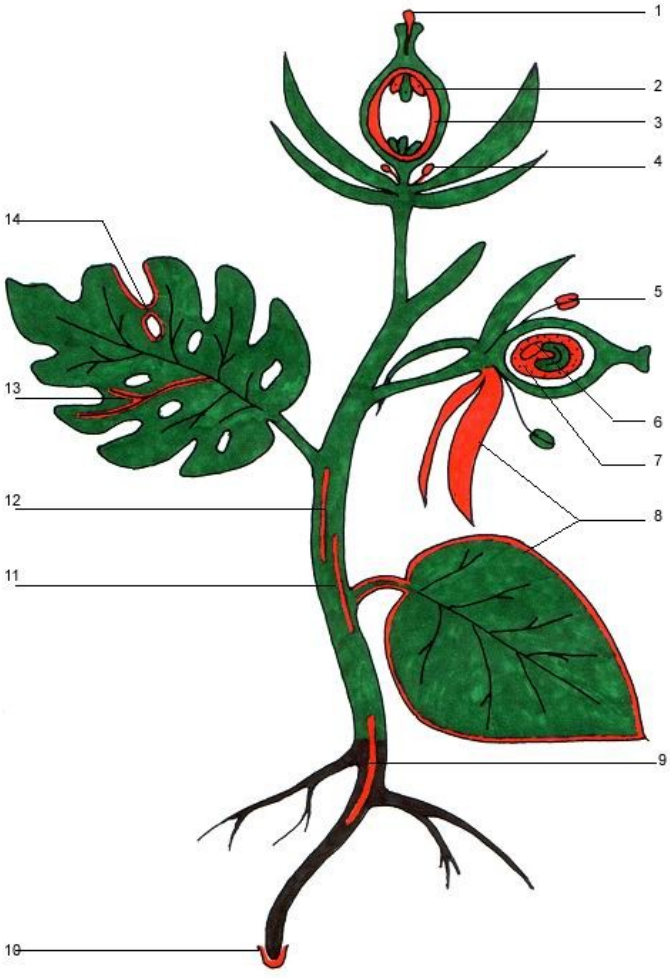
Za povšimnutí ještě stojí otázka, jak se rostliny vypořádávají s absencí fagocytujících buněk, které jsou schopné zlikvidovat zbytky odumírajících buněk včetně nebezpečných hydrolytických enzymů, jež se v buňkách podstupujících PCD beze sporu uplatňují a mohly by poškodit okolní pletivo. Odpovědí může být přítomnost látek blokujících činnost takových enzymů. Jako příklad uveďme protein TED4, jehož zvýšená tvorba byla identifikována ve vznikajících TEs v buněčné kultuře *Zinnia elegans* i *in vivo* (viz dále). Tento protein je z buněk vyplavován do mimobuněčných prostor ještě před dokončením vlastní PCD a bylo prokázáno, že blokuje činnost proteasomu 26S. Přítomnost téhož proteinu byla zaznamenána i u vznikajících článků sítkovic nebo vláknitých sklereid, další proteiny ze stejné skupiny (nsLTPs) jsou syntetizovány v buňkách tapeta nebo v odumírajících aleuronových buňkách, což naznačuje, že by se mohlo jednat o obecnější model uplatňovaný v různých případech rostlinné PCD (Endo et al. 2001).

Pro úplnost je třeba dodat, že výše uvedené dělení rostlinné PCD na tři typy není uznáváno zcela bezvýhradně. Staví se proti němu např. (Van Doorn et al. 2011), kteří zavádějí novou klasifikaci. Podle ní je možné zařadit smrt buňky buď pod tzv. vakuolární buněčnou smrt (v podstatě obdoba autofagie) a nebo pod nekrózu. Zcela zavrhují kategorii „apoptóze podobné buněčné smrti“, neboť podle nich u rostlin nic takového neexistuje. Své tvrzení opírají o skutečnost, že k fragmentaci a kondenzaci DNA může docházet i u dvou zbývajících typů PCD. Kromě toho v rostlinných pletivech chybí fagocyty a navíc zde fagocytaci brání přítomnost buněčných stěn. Kaspázy jako důkaz uvedeného typu CD autoři odmítají, neboť pravé kaspázy v rostlinných buňkách nalezeny nebyly a enzymy s obdobnou aktivitou podle nich přímo nesouvisejí s procesy, které by vykazovaly podobnost s apoptózou. Další dva typy CD (ač sami připouštějí, že některé případy rostlinné CD, např. hypersenzitivní reakce, jsou jejich „směsí“) tedy charakterizují následovně: vakuolární buněčná smrt je podle nich pomalejší a spočívá v postupném spojování a zvětšování vakuol, které do sebe postupně uzavírají jinak intaktní organely (s výjimkou jádra, to může mít porušenou membránu a být fragmentované) a rozkládají je. V poslední fázi se může začít rozpadat tonoplast a vylijí se hydrolytické enzymy, které rozloží cytoplazmu, zbývající organely a většinou i buněčné

stěny. Průvodním jevem je mj. shlukování aktinových vláken. Jako metody schopné prokázat tento typ CD jsou uváděny TEM, biochemické postupy zaměřené na aktivitu hydroláz a protilátkové značení aktinu. Oproti tomu nekróza je proces poměrně rychlý (trvající maximálně jeden den), zahájený porušením integrity plazmalemy, které vyvolá smrštění protoplastu. Průvodním jevem je zvýšení koncentrace cytoplazmatického vápníku a produkce ROS v důsledku degradace mitochondrií a chloroplastů. Málokdy je protoplast rozložen beze zbytku, neboť se procesu neúčastní dostatečné množství lytických enzymů ze specializovaných vakuol. Pro detekci těchto změn autoři doporučují opět TEM a metody sledující koncentraci $Ca^{2+}$ a ROS.

Výskyt PCD u rostlin:

Jak již bylo uvedeno výše, k procesům označovaným jako programovaná buněčná smrt dochází u rostlin jednak v rámci běžného vývoje ve fázi vegetativní i generativní, jednak vlivem abiotických i biotických vnějších faktorů (Pennel and Lamb 1997). Schéma viz obr. 2.3.



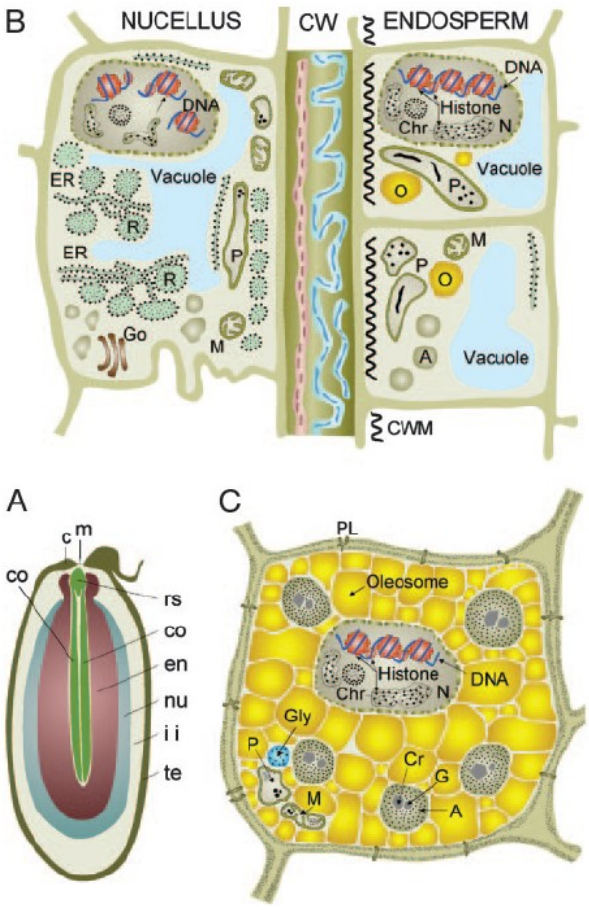

*Obr. 2.3. Výskyt PCD v rostlinném těle, upraveno podle (Pennel and Lamb 1997), (Buckner et al. 1998).*
*1. smrt nekompatibilního pylu*
*2. smrt synergid*
*3. odstranění megaspor*
*4. degradace květních základů druhého pohlaví (jedopohlavné květy)*
*5. degenerace tapeta, praskání prašníků*
*6. degenerace suspenzoru*
*7. zrání endospermu, u trav PCD aleuronových buněk*
*8. senescence květních obalů a listů, opad*
*9. vznik lyzigenního aerenchymu*
*10. oddělování buněk kořenové čepičky*
*11. vznik cévních elementů*
*12. vznik floému*
*13. hypersenzitivní reakce*
*14. listové vykrajování a perforace (Lenochová et al. 2004a)*

PCD v průběhu vývoje rostliny

Již v průběhu zárodečného vývoje jsou některé buňky tvořící součást budoucího semena odsouzeny k zániku. Jedná se např. o buňky suspenzoru, jejichž postupná degradace, zahrnující tvorbu membránami ohraničených tělísek, porušení tonoplastu nebo fragmentaci jaderné DNA, byla zjištěna mj. u *Phaseolus sp*., *Tropaeolum sp.*, *Vicia faba* a *Zea mays*. Látky, které se tímto způsobem uvolní, jsou pravděpodobně použity pro výživu embrya, jehož vývoj jejich osud do jisté míry řídí. To je zřejmé např. z toho, že pokud je vývoj embrya porušen, odumírání suspenzorových buněk je zastaveno. Někdy se tyto buňky dokonce začnou chovat jako buňky embrya (Beers 1997;Dangl et al. 2000;Wredle et al. 2001;Giuliani et al. 2002).

Kromě suspenzorových buněk odumírají i jiná pletiva tvořící součást embrya. Jsou jimi např. buňky štítku (scutellum), koleoptile a kořenové čepičky u kukuřice nebo buňky endospermu u dalších druhů zkoumaných rostlin (Giuliani et al. 2002;Wredle et al. 2001). Endosperm je triploidním pletivem vyživujícím vyvíjející se embryo. Zatímco u některých rostlin (např. *Ricinus communis*) podléhají jeho buňky PCD poté, co splní tuto svou „vyživovací povinnost“, u trav umírají buňky tzv. škrobového endospermu poměrně záhy, ale látky v nich obsažené jsou embryu dodávány postupně díky hydrolytickým enzymům uvolňovaným ze speciální, tzv. aleuronové vrstvy. Aleuronové buňky tvoří součást endospermu, ale kvůli této své zvláštní úloze zůstávají naživu až do doby, kdy jsou všechny zásobní látky ze škrobového endospermu využity embryem. V té chvíli ztrácejí aleuronové buňky svou úlohu a podstupují PCD, jejich obsah je pravděpodobně rovněž využit embryem při klíčení. Lze se však setkat i s tvrzením, že aleuronové buňky nehynou cestou PCD a že výsledky, které tomu napovídají, jsou ve skutečnosti artefakty způsobené nevhodně zvolenými metodami (Fath et al. 1999). Podobnou roli jako endosperm hraje u některých rostlin, např. u ječmene, i výše uvedený štítek. PCD endospermu u různých rostlin nese jak znaky autofagie, tak apoptotické buněčné smrti. Jsou jimi např. tvorba apoptotického žebříčku nebo nárůst cytoplazmatické koncentrace vápenatých iontů. Jednotlivé procesy spojené se zráním embrya a klíčením jsou řízené jednak vnějšími podmínkami (např. v důsledku bobtnání semena), jednak zde významnou roli hrají fytohormony – GA průběh PCD podporuje, ABA ji naopak inhibuje (Dangl et al. 2000;Gietl and Schmid 2001;Greenwood et al. 2005;Lindholm et al. 2000;Pennel and Lamb 1997;Wang et al. 1998;Wredle et al. 2001). Speciální organelou zapojenou do smrti buněk endospermu jsou tzv. ricinosomy (zmíněné již výše), membránou ohraničené útvary poseté ribosomy a obsahující mj. specifickou cysteinovou endopeptidázu papainového typu. Ta je z ricinosomů

uvolňována a účastní se rozkladných procesů nejen při degradaci endospermu, ale už před tím stejným způsobem doprovází rozklad buněk nucellu, jejichž použitelné pozůstatky pak přecházejí přes speciální klkovité výrůstky do vnějších vrstev expandujícího endospermu, obr. 2.4, (Gietl and Schmid 2001;Greenwood et al. 2005).




*Obr. 2.4. Semeno Ricinus communis, přibližně 20 dní po opylení. A – průřez vyvíjejícím se semenem (en – endosperm, nu – nucelus), B – rozhraní mezi buňkami endospermu a nucelu (cw – buněčná stěna), C – buňka nucelu (A – aleuronová zrna, R – ricinosomy, Cr – krystaloid, G – globoid, (Greenwood et al. 2005).*

Stejně jako v případě přirozené embryogeneze, setkáváme se s PCD i u tzv. embryogeneze somatické, tedy v buněčné kultuře. Nejčastěji používaným výzkumným materiálem je buněčná kultura *Picea abies*, která je fytohormonálně indukována k tomu, aby se její buňky začaly vyvíjet v buňky embryonální. První vlna PCD nastupuje hned po prvním dělení, kdy odumírají dále se neměnící buňky proembryogenní hmoty, druhá vlna buněčných sebevražd odstraní buňky suspenzorové. V obou případech byly zaznamenány pozitivní výsledky TUNEL reakce, fragmentace DNA i autofagické odbourávání organel v buňkách s dosud neporušeným tonoplastem (Pennel and Lamb 1997;Filonova et al. 2000). Je pravděpodobné, že významnou roli při rozhodování o tom, které buňky zůstanou naživu a které budou nuceny podstoupit PCD, hraje mj. cytoskelet. (Schwarzerova et al. 2010) zjistili, že pokud jsou somatická embrya vystavena působení latrunculinu B, účinného jedu z mořské houby *Latrunculia magnificans*, který blokuje polymerizaci aktinu (Morton et al. 2000), je vzápětí spuštěna degradace suspenzorových buněk, zatímco buňky embrya zůstávají ušetřeny. Další výzkum ukázal, že se ve studovaných somatických embryích vyskytují čtyři izoformy aktinu, z toho jedna v obou typech buněk, zatímco zbývající tři pouze v suspenzoru, kde se během vývoje, stejně jako působením latrunculinu, jejich exprese výrazně snižuje. Tímto

způsobem se autorům podařilo odstranit z kultury embrya nedostatečně vyvinutá (s převažujícím podílem suspenzorových buněk) a synchronizovat vývoj přeživších embryí. Tento výsledek bude dost možná využitelný i v biotechnologické praxi (Schwarzerova et al. 2010).

Dalším případem rostlinné PCD je vznik tracheálních elementů a sklerenchymatických vláken. Oba uvedené buněčné typy jsou součástí vodivých pletiv, kde tvoří přímo transportní xylémové dráhy nebo opěrná pletiva. Jejich skonu předchází důkladná příprava spočívající ve vytvoření silné lignifikované sekundární buněčné stěny, která zajišťuje to, že cévy odolají silnému transpiračnímu sání a sklerenchymatické buňky (někdy po určitou dobu přežívající) mohou zastávat účinně svou mechanickou funkci. Intenzivněji studován je vývoj tracheálních elementů, jistě i díky existenci buněčné kultury listového mezofylu *Zinnia elegans* indukovatelného k přeměně na tracheální elementy (tracheary elements, TEs). Pomocí studií prováděných na této kultuře, ale i *in vivo*, bylo zjištěno, že PCD v těchto buňkách probíhá velmi rychle. Poté, co je dokončena tvorba sekundární buněčné stěny včetně perforací na konci sousedícím s již zralým tracheálním elementem (nebo na jednom konkrétním konci samostatné buňky, v případě buněčné kultury), je prvním krokem signalizujícím nástup PCD zvýšení cytosolické koncentrace vápenatých iontů. Následuje změna propustnosti tonoplastu (dokumentovaná např. pomocí fluoresceinu), z nějž se pravděpodobně uvolňují lytické enzymy, např. aspartátová proteáza fytepsin, a poté rychlá degradace endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, chloroplastů a jádra, které nepředcházejí žádné typické jevy spojené s PCD apoptotického typu, jako je kondenzace chromatinu, fragmentace DNA apod. Během krátké doby je pak protoplast zcela rozložen a cévní element se stává pouze dutou trubicí, jejíž jeden konec je tvořen perforační deskou, druhý je dosud uzavřen a čeká na diferenciaci přilehlého cévního článku. Polarita uvedených procesů je zřejmě ovlivněna funkcí auxinů, vzniku perforací se účastní polygalakturonázy. Vznik TEs se v některých ohledech podobá tvorbě lyzigenních aerenchymatických kanálů (viz níže), např. v obou případech je zcela odbourán protoplast a takto vzniklé prostory následně slouží transportu látek na dlouhé vzdálenosti. Stejně tak lze ale mezi těmito procesy najít rozdíly, jako je do určité míry odlišný průběh PCD, jiný meristematický původ takto vznikajících buněk i fakt, že buněčné stěny TEs jsou nejen zachovány, ale hrají v dalším životě rostliny zásadní roli (Beers 1997;Groover and Jones 1999;Roberts and McCann 2000;Roberts and McCann 2000;Nakashima 2000;Kuriyama 1999;Obara et al. 2001;Lindholm et al. 2000;Kozela and Regan 2003).

Se vznikem TEs souvisí, přinejmenším funkčně, způsob vzniku sítkových elementů (sieve elements, SEs). I u nich jsou funkční až buňky, které podrobily své protoplasty autolýze. Liší se však v tom, že narozdíl od výše uvedeného případu se zde neodbourává protoplast jako celek, nýbrž dochází k selektivní degradaci jen některých jeho organel, např. jádra, ribosomů a Golgiho aparátu a k přestavbám mitochondrií a plastidů. Takto změněné buňky se pak stávají zcela závislými na buňkách ve svém těsném sousedství, konkrétně na průvodních buňkách, které s nimi mají společný původ v jedné buňce mateřské (Beers 1997;van Bel et al. 2002).

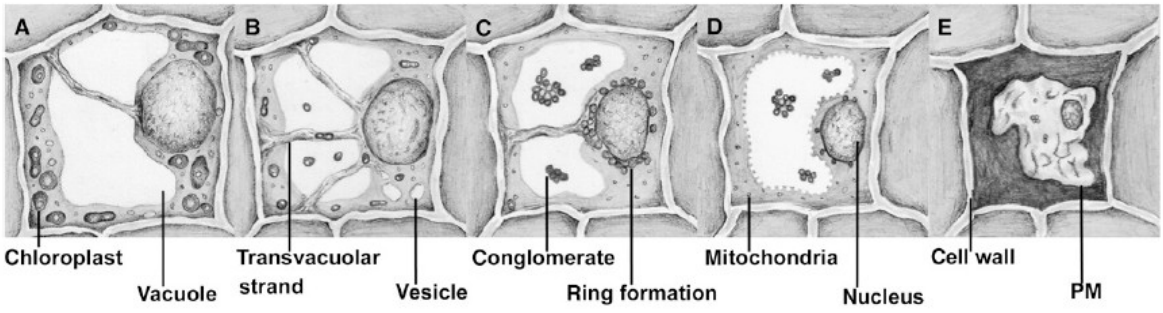


*Obr. 2.5. Ilustrace znázorňující sítkový element jako pacienta upoutaného v komatu na lůžko a zcela závislého na péči sestry, tedy průvodní buňky, s níž je propojen četnými plazmodezmy. Výrazná metabolická aktivita průvodní buňky je dokumentována mj. vysoce denzní cytoplazmou a množstvím mitochondrií (van Bel et al. 2002).*

Mezi sklerenchymatickými buňkami jsou sklerenchymatická vlákna se svou PCD spíše výjimkou než pravidlem, sklerenchymatické buňky většinou tímto procesem neprocházejí. Příkladem jsou hvězdicovité sklereidy roztroušené ve stěnách aerenchymatických kanálů v listech stulíku (*Nuphar*) a plavínu (*Nymphoides*). Jedná se o buňky se silnou sekundární buněčnou stěnou inkrustovanou šťavelanem vápenatým a dalšími vápenatými solemi. I po jejím vytvoření zde ale panuje čilá metabolická aktivita a tvoří se četné diktyosomy. Funkce takovýchto buněk je pravděpodobně jednak mechanická, jednak ochranná, neboť jejich přítomnost mechanicky a pravděpodobně i chemicky znepříjemňuje herbivorům konzumaci takového pletiva (Kuo-Huang et al. 2000).

Poměrně řídce se vyskytujícím případem rostlinné PCD je proces vzniku vykrajovaných listů a listových perforací. Ač u druhého jmenovaného jevu toto tvrzení zřejmě nikoho nezarazí, neboť málokdo zná více rostlin s přirozeně perforovanými listy než je *Monstera* (anglicky „swiss cheese plant“), množství běžně se vyskytujících nejrůzněji laločnatých, zubatých a jinak na okrajích „zdobených“ listů vede k podvědomému nesouhlasu s tvrzením prvním. Avšak typické tvary listových čepelí bývají důsledkem smrti jen několika buněk v listovém

primordiu. Jelikož se tyto buňky dále nedělí, vzniká ve vztahu k okolí relativně větší prázdné místo. PCD by teoreticky mohla být zodpovědná za členění palmových listů, k němuž dochází až ve chvíli, kdy je listová čepel vytvořená, ale tento materiál nebyl z hlediska PCD blíže zkoumán. Známo je zatím jen tolik, že při jednom ze dvou způsobů vzniku členěných palmových listů k odumírání buněk dochází a že lze najít podobnost mezi tímto procesem a tím, co se odehrává v opadových zónách při opadu listů apod. (Gunawardena and Dengler 2006;Greenberg 1996). *Monstera* je tedy v tomto ohledu jakousi výjimkou, k níž díky novým výzkumům přibyla ještě vodní rostlina z čeledi *Aponogetonaceae*, *Aponogeton madagascariensis*. tj. kalatka madagaskarská. Tato rostlina nese opět výmluvné anglické označení - „lace plant“, tedy „krajková rostlina“. Nepopíratelnou výhodou tohoto biologického materiálu je fakt, že v jeho listu odumírají buňky na přesně determinovaných místech a navíc, narozdíl od listů *Monstera*, ukázněně a organizovaně, postupně od centra budoucího „okénka“ k jeho okrajům. Průběh jejich PCD je charakterizován odbouráváním buněčných barviv, následovaným přítomností fragmentace jaderné DNA, porušením integrity tonoplastu a rozkladem buněčného obsahu i buněčných stěn. Okolní mezofylové buňky poté rediferencují v buňky pokožkové a nově vzniklá „okénka“ pak vypadají, jako by v čepeli byla vždy (Beers 1997;Gunawardena et al. 2004;Gunawardena et al. 2005;Gunawardena et al. 2007). Vlastní průběh PCD připomíná do jisté míry PCD při tvorbě TEs, avšak liší se např. v tom, že před porušením tonoplastu se sníží počet i velikost chloroplastů, je z nich stažen škrob i chlorofyl, čímž tento proces připomíná spíše senescenci (viz dále). Někteří autoři dokonce předpokládají, že role chloroplastů v procesu PCD nemusí být jen pasivní, nýbrž že se tyto organely mohou aktivně účastnit jejího spuštění, ať už produkty svých genů nebo např. tvorbou ROS (Wright et al. 2009). Dalším předpokládaným hráčem v PCD v listech kalatky je $Ca^{2+}$, což bylo prokázáno pomocí rutheniové červeni, která blokuje vápníkové kanály, čímž výrazně snižuje počet perforací na listovou plochu (Elliott and Gunawardena 2010).




*Obr. 2.6. Ilustrace zachycující průběh PCD při vzniku perforací v listech Aponogeton madagascariensis. A – zdravá buňka s četnými a velkými chloroplasty obsahujícími škrobová zrna, některé chloroplasty se dělí, mitochondrie i jádro jsou nezměněné, vakuola velká. B – snižuje se počet chloroplastů i škrobových zrn, některé chloroplasty se ještě stále dělí. Zvyšuje se množství cytoplazmatických provazců, pravděpodobně spojených s transportem chloroplastů. Chloroplasty se objevují ve vakuole, tvoří se váčky. C – snižuje se počet cytoplazmatických provazců, zbylé chloroplasty tvoří kruh okolo jádra, množství buněčného materiálu se objevuje ve vakuole. D – Náhle ustává pohyb mitochondrií a smršťuje se jádro, pravděpodobně v důsledku prasknutí tonoplastu, cytoplazmatické provazce mizí, Brownův pohyb organel ve vakuole pokračuje. E – plazmalema se odděluje od buněčné stěny, probíhá poslední fáze buněčné degradace. Celý proces trvá asi 2 dny, od porušení tonoplastu do konce pouze 15 – 20 min (Wright et al. 2009).*

---

Mezi pletiva, v nichž se odehrává PCD, jsou řazena i pletiva podílející se na opadu (abscisi) rostlinných orgánů nebo jejich částí. Buňky vyskytující se na hranici mezi rostlinou jako celkem a její částí, která má být odstraněna, vykazují někdy vysokou metabolickou aktivitu, jindy typické znaky PCD. K jejich oddělení od zbytku rostlinného těla je nutné rozpuštění buněčných stěn, mnohdy doprovázené smrtí několika buněčných vrstev. Tento proces bývá spojen se stárnutím orgánů nebo je odpovědí na působení stresu, ale lze sem řadit i populace buněk kořenové čepičky, označované jako buňky hraniční. Tyto buňky, lokalizované na povrchu kořenové čepičky rostlin mnoha čeledí, se od ní průběžně odlupují, ale zůstávají naživu po dlouho dobu (i několik měsíců), po niž produkují jednak polysacharidy a další slizové látky napomáhající prorůstání čepičky půdou, jednak řadu signálních molekul významných pro interakce kořene s okolními organismy. Jejich prostřednictvím jsou ke kořeni lákány např. drobné hlístice, které jsou zde následně paralyzovány až do doby, kdy zranitelná kořenová špička bezpečně odroste z jejich dosahu. Hraničními buňkami produkované látky mohou sloužit jako obrana před patogenními houbami a bakteriemi, ale na druhou stranu napomáhají v komunikaci s houbami vstupujícími s rostlinou do mykorhizního vztahu. Proces zániku těchto buněk jeví známky PCD (Beers 1997;Lindholm et al. 2000;Pan

et al. 2002). Ačkoli některé rostliny, např. *Arabidopsis thaliana*, postrádají typické hraniční buňky, vykazují buňky vnějších vrstev jejich kořenové čepičky znaky charakteristické pro PCD, jakými je pozitivní TUNEL reakce nebo změny organel (Zhu and Rost 2000).

Dalším případem rostlinné PCD je proces spojený se stárnutím neboli senescencí. Jedná se o jeden z nejpomalejších typů buněčného hynutí, v jehož průběhu jsou ze stárnoucí části rostliny postupně stahovány a do sinků odváděny využitelné látky. Týká se to např. i chlorofylu, což spolu se syntézou karotenoidů a antokyanů přispívá k tomu, že je stárnutí listů spojeno s barevnými změnami asimilačních pletiv (Dangl et al. 2000). Teprve po této fázi zahrnující řadu katabolických procesů přichází na řadu buněčná smrt v užším slova smyslu. Spouštěče procesů zapojených do senescence jsou endogenní (ontogenetické stádium, opylení kompatibilním pylovým zrnem) i exogenní (stres, přísun živin, chemické látky - např. etylén), (Beers 1997). Etylén jako jeden z fytohormonů se přirozeně účastní projevů spojených se stárnutím alespoň některých rostlinných orgánů. Rostlina jej tvoří v závislosti na ontogenetických změnách nebo v reakci na působení vnějších podmínek. Příkladem takové situace je dosednutí pylového zrna na bliznu a následné kompatibilní opylení u *Petunia inflata*, které je provázeno zvýšenou produkcí ACC syntázy, ACC oxidázy a následně samotného etylénu. Na tento proces navazuje senescence květních obalů spojená nejprve se změnou barvy a poté sesycháním a opadem korunních lístků (Tang and Woodson 1996;Singh et al. 1992;Inada et al. 1999).

U stárnoucích květních obalů u petunie byl také podrobně sledován sled a načasování vnitrobuněčných změn vedoucích ke smrti buněk daného pletiva. Je zajímavé, že ač je tonoplast porušen hned v počátku, vyplavené hydrolytické enzymy a nově syntetizované DNázy a RNázy se uplatní až v konečných fázích celého procesu, když je poškozen jaderný obal a z jiných organel jsou odčerpány dosud využitelné látky. Do 36 h po opylení přijdou senescentní buňky téměř o všechnu RNA a škrob, výrazně se sníží množství v nich obsažených proteinů a rovněž je z nich stažena velká část vody (Xu and Hanson 2000).

Van Doorn et al. (2003) se ve své rozsáhlé studii zabývali průběhem kvetení a senescencí korunních lístků u *Iris hollandica*. Zaměřili se jak na změny symplazmického propojení mezofylových a pokožkových buněk v těchto částech rostlin, tak na jejich ultrastrukturní změny pozorované prostřednictvím TEM a SEM a na expresi více než dvou set strukturních i regulačních genů. Ještě před otevřením květů zaznamenali uzavření plazmodezmů v obou typech pletiv (v mezofylu s jednodenním předstihem) a přesun uhlíku a dusíku v podobě sacharózy, asparaginu a glutaminu. Následovalo postupné splývání vakuol a degradace

většiny cytoplazmy a cytoplazmatických membránových organel typu GA nebo ER. Obdobně jako autoři studie prováděné na petunii pozorovali i tito až do pozdních fází PCD zachované chloroplasty a jádra s kondenzovaným chromatinem. Ve fázi dospívání květu i při jeho senescenci se výrazně uplatňovaly geny kódující enzymy odbourávající fosfolipidy, proteiny i buněčné stěny (lipoxygenáza C, cysteinová proteáza, pektin methylesteráza aj.). V závěrečných fázích se poněkud překvapivě exprimovala řada genů zapojených do „obranných reakcí“, jakými jsou chloroplastová terpen syntáza nebo ribosom-inaktivující proteiny. Významnou roli v iniciaci senescence podle autorů pravděpodobně hraje membránový kanál regulovaný cyklickým nukleotidem (např. cAMP) a mající pravděpodobně vliv na vtok vápenatých kationtů do cytoplazmy, což může být příčinou uzavírání plazmodezmů. V návaznosti na tento výzkum bylo zjištěno, že projevy senescence korunních lístků u *I. hollandica* jsou efektivně inhibovány narciclasinem, heterocyklickou látkou obsaženou v pletivech *Narcissus sp.* (Van Doorn et al. 2004). Aplikace inhibitorů cysteinových proteáz a proteasomů měla na uvedený rostlinný materiál obdobný efekt (Pak and Van Doorn 2005).

Jiné případy senescence jsou provázeny dalšími typickými znaky PCD, jako je fragmentace jaderné DNA a vznik „apoptotických“ žebříčků nebo pozitivní TUNEL reakce, což bylo sledováno např. u degenerujícího koleoptile rýže, jímž prorůstá nový list (Kawai and Uchimiya 2000). Ani senescence však nemusí být přesvědčivou „programovanou“ buněčnou smrtí, alespoň ve smyslu znaků typických pro apoptózu. Příkladem je mezofyl listů mladých rostlin rýže, jež podstupují předčasnou senescenci zapříčiněnou působením tmy. V tomto pletivu nebyly rozpoznány ani charakteristické ultrastrukturní změny, ani vznik oligosomálních DNA-fragmentů. Pozitivní zde byla pouze TUNEL reakce, avšak taková pletiva s fluoresceinem obarvenými jádry byla patrná už v dosud svinutých listech (Lee and Chen 2002).

Ani generativní ontogenetické stádium se u rostlin neobejde bez PCD. U některých rostlin s jednopohlavnými květy (*Asparagus, Zea, Silene sp.*) je tento proces zodpovědný za odbourání základu samčích nebo samičích pohlavních orgánů. Provázený je např. prasknutím tonoplastu nebo produkcí steroidních látek spouštějících PCD samičích pohlavních orgánů (Greenberg 1996;Jones and Dangl 1996).

Ani pokud je samčím pohlavním orgánům dáno dospět, PCD se nevyhnou. Otevírání prašníků zahrnuje řízené a koordinované umírání buněk tapeta, buněk v oblasti stomia a pokožkových buněk k nim přiléhajících, nestejnoměrně sesychajících buněk endothecia a buněk konektivu.

Působení stresu (osmotického, teplotního, hladovění) odumírání uvedených pletiv podpoří, čímž zvyšuje životaschopnost mikrospor. Ty pak mohou být efektivněji využitelné např. při androgenezi, tedy *in vitro* pěstování rostlin z nezralých mikrospor (Beers 1997;Chichiricco 2000;Wang et al. 1999;Korthout et al. 2000). Příliš časná PCD v samčích pohlavních orgánech může být ale pro rostlinu fatální, jako je tomu u slunečnice s mutací v mitochondriálním genu *PET-CMS (cytoplasmic male sterility)*, jejímž důsledkem je degradace prašníkových pletiv ještě v době meiotického dělení mateřských buněk mikrospor, což ústí ve sterilitu samčích pohlavních orgánů v daných rostlinách (Balk and Leaver 2001).

Ani pylové zrno, které úspěšně dosedne na bliznu, začne se hydratovat a klíčit v pylovou láčku, nemá vyhráno. Jestliže se totiž jedná o pylové zrno „inkompatibilní", tedy buď o pyl z rostliny jiného druhu nebo naopak o pyl z rostliny, na niž dosedl, je takové pylové zrno ve většině případů odsouzeno k PCD. U čeledí *Solanaceae, Rosaceae* a *Scrophulariaceae* je tím vinen tzv. S-lokus kódující čnělkové S-RNázy. Ty zastaví proteosyntézu v klíčící láčce, což vede v zápětí k její smrti. U *Papaver rhoeas* vzniká na základě genů čnělkového S-lokusu protein, který v pylové láčce z vlastní rostliny spouští signální kaskádu vedoucí k PCD (Beers 1997;Thomas and Franklin-Tong 2004). Obdobně je tomu u *Brasica napus*, kde se při samoopylení na kinázu, která je produktem S-lokusu ve čnělkovém pletivu, váže protein produkovaný podle S-lokusu pylového zrna, což ve výsledku vede k odmítnutí vlastního pylového zrna (Zhang et al. 2011).

Pokud je pylovému zrnu dovoleno prorůstat v podobě pylové láčky ke klovému otvoru, doplatí na to životem buňky čnělkového pletiva, jež pylové láčce „stojí v cestě". Jednak je tím odbourávána mechanická bariéra, jednak pylová láčka zřejmě čerpá látky nutné pro svůj růst z degradovaných buněk. Průvodním jevem je degradace několika skupin mRNA, tentokrát ovšem těch čnělkových (Greenberg 1996;Wang et al. 1996).

V oblasti samičích pohlavních orgánů se PCD pravděpodobně uplatňuje i při vzniku zárodečného vaku (u 70 % rostlinných druhů zde zanikají 3 ze 4 megaspor) a po kompatibilním opylení při odbourání synergid, které je mj. provázeno akumulací vápenatých iontů v oblasti mikropyle a jejich přesunem právě do synergid (Beers 1997). V případě PCD megaspor u tilandsie bylo popsáno, že vždy tři buňky z tetrády jsou ohraničeny silnější vrstvou kalózy, což jim pravděpodobně omezuje přísun živin a signálních látek. Tyto buňky pak podstupují kaskádu kroků zahrnujících tvorbu autofagosomů, fragmentaci DNA a anatomické změny ER. Čtvrtá buňka, jež své sesterské buňky přežívá, zůstává od jejich ostatků oddělena vlastní tenkou vrstvou kalózy (Papini et al. 2011).

PCD v reakci na vlivy okolního prostředí

Programovaná buněčná smrt je odpovědí na útok patogenů při tzv. hypersenzitivní reakci (HR), kdy se díky ní patogen stává pro rostlinu nevirulentním. Výsledkem hypersenzitivní reakce jsou suché jizvy tvořené odumřelými buňkami, lokalizované především v okolí cévních svazků, jež pak nemohou napomáhat systémovému rozšíření patogenu. U A*rabidopsis thaliana* infikované avirulentním kmenem *Pseudomonas syringae* nebo u rajčete vystaveného působení *Cladosporium fulvum* byl nástup uvedené reakce pozorován i v nenapadených částech rostlin, což ukazuje na jejich systémovou rezistenci (Pennel and Lamb 1997). Buňky tvořící kalus u hvozdíku *Dianthus caryophyllus*, jež jsou ve styku s houbou *Fusarium oxysporum dianthi*, zesilují své buněčné stěny a ucpávají plazmodezmy (Trillas et al. 2000). Hypersenzitivní reakce může být vyvolána virem (tabáková mozaika a *Nicotiana tabacum*), bakterií (viz výše nebo např. Gram-negativní bakterie *Pseudomonas avenae* a rýže) nebo houbou (*Vigna sp.* a houba *Uromyces vignae*). Ke spuštění kroků ústících v HR může vést i pouhé setkání s houbovým elicitorem, jako je tomu v případě kryptogeinu, který je produkován houbou *Phytophtora cryptogea*. U tabáku je HR spojená s vyplavováním $NO_3^-$ z buňky, vtokem extracelulárního $Ca^{2+}$, oxidativním vzplanutím a aktivací řady genů. (Che 1999;Xu and Heath 1998;Mittler et al. 1997;Wendehenne et al. 2002).

Klíčovou se pro HR alespoň v některých případech zdá být vakuola, a to jak jako zdroj hydrolytických enzymů likvidujících přímo napadenou buňku, jako je tomu v případě napadení tabáku virem tabákové mozaiky, tak i jako místo, odkud se ničivé enzymy po splynutí tonoplastu s plazmalemou vylévají do okolí a likvidují tím patogenní bakterie, čímž se rostlina vůči takovému patogenovi stává rezistentní (případ huseníčku a *Pseudomonas syringae*). V obou uvedených procesech se uplatňují proteolytické enzymy s aktivitou kaspáz, VPE a proteasom (více viz úsek věnovaný kaspázám u rostlin). Bylo zjištěno, že VPE je aktivováno nejen buňkou samotnou, ale této buněčné zbraně dokáže zneužít houba *Fusarium moniliforme*, která svým toxinem fumonisin B1 spustí v napadené buňce huseníčku PCD, čímž si připraví prostor a živiny pro vlastní růst a šíření dále do hostitelského organismu (Hatsugai and Hara-Nishimura 2010). U *Nicotiana benthamiana* způsobuje VPE kromě odumírání buněk ošetřených bakteriálními a houbovými elicitory i uzavírání průduchů a ve svěracích buňkách i zvýšení produkce NO jako látky zahrnuté do signální kaskády v mnoha případech PCD (Zhang et al. 2010).

Dalším faktorem, který může značně ovlivnit fyziologický i anatomický stav rostliny, je hypoxie, vyvolaná v přírodě většinou zaplavením větší či menší části rostlinného těla, ale

v určitých vývojových fázích a pletivech se vyskytuje i přirozeně, např. při klíčení nebo v pletivech zásobních orgánů. Reakcí na snížení dostupnosti kyslíku jsou u odolných rostlin či pletiv fyziologická a anatomická přizpůsobení. Fyziologické změny spočívají především v přechodu k anaerobnímu metabolismu, což je soubor reakcí zahrnujících u rostlin mj. glykolýzu a alkoholové kvašení. K ethanolové fermentaci přistupují rostlinné buňky až poté, co se zvýší množství laktátu v cytoplazmě, přičemž rychlost tohoto nástupu je jedním z faktorů ovlivňujících schopnost rostliny přežít v zaplaveném prostředí. Úspěch takovéto strategie je podmíněn dostatkem zásobních látek a včasnou syntézou enzymů zapojených do glykolýzy a fermentace, výhodou bývá přechodné stádium mírné hypoxie. Mezi enzymy, jejichž produkce je pro přežití v hypoxických až anoxických podmínkách zásadní, patří např. LDC (laktátdehydrogenáza), ADH (alkoholdehydrogenáza), PDC (pyruvátdehydrogenáza) nebo SOD (superoxid-dizmutáza), která chrání rostlinu po návratu do aerobních podmínek před dopady ROS. Impulzů vedoucích k zapojení anaerobních metabolických drah je více a uplatňuje se pravděpodobně jejich kombinace. Jedním z nich je „energetická krize“ plynoucí z náhlého nedostatku ATP, jehož produkce se omezením oxidativní fosforylace výrazně sníží. Ruku v ruce s tím jde „cukerná krize“, zapříčiněná zatopením fotosyntetizujících částí rostlin, ale i uzavíráním průduchů v orgánech dosud nezatopených. V dalších fázích se k příčinám připojí i zvýšená aktivita enzymů zapojených do rozkladu transportních a zásobních sacharidů, např. sacharóza syntázy. Stav zaplavené rostliny je významně ovlivněn i toxickými metabolity dalších živých složek rhizosféry, např. v podobě redukované formy manganu, železa a síry ($Mn^{2+}$, $Fe^{2+}$, $S^{2-}$). Významnou úlohu hrají zřejmě i ROS ($O_2^-$, $H_2O_2$, $OH^-$, NO), jejichž množství vzrůstá jak s nástupem hypoxických podmínek, tak s návratem do aerobního stavu. Tyto látky mohou reagovat s proteiny, lipidy i nukleovými kyselinami a tím vést až k mutacím, mají však i signální a obrannou funkci. Za normálních okolností je množství těchto sloučenin pufrováno různými mechanismy, a to jak enzymaticky (kataláza, peroxidáza, superoxid dismutáza), tak metabolicky (askorbát, glutathion, tokoferol, prolin, ferritin apod.). Alternativou k alkoholovému kvašení může být využití dusitanů či dusičnanů jako konečného akceptoru elektronů na konci dýchacího řetězce v anaerobních podmínkách. Okyselování cytoplazmy, které je důsledkem produkce $H^+$ řadou cytoplazmatických enzymů uplatňujících se v anaerobním metabolismu, je pravděpodobně vyváženo čerpáním $H^+$ iontů přes tonoplast do vakuoly za současné produkce ATP tonoplastovou ATPázou. Do metabolismu dusičnanů, dusitanů a produkce NO jako látky se signální funkcí je pravděpodobně zapojen i hemoglobin I. třídy, který by možná mohl hrát roli i ve vnímání množství kyslíku v rhizosféře, neboť je schopen regulovat hladinu kyslíku tím, že jej na sebe váže. Bylo prokázáno, že jeho syntéza

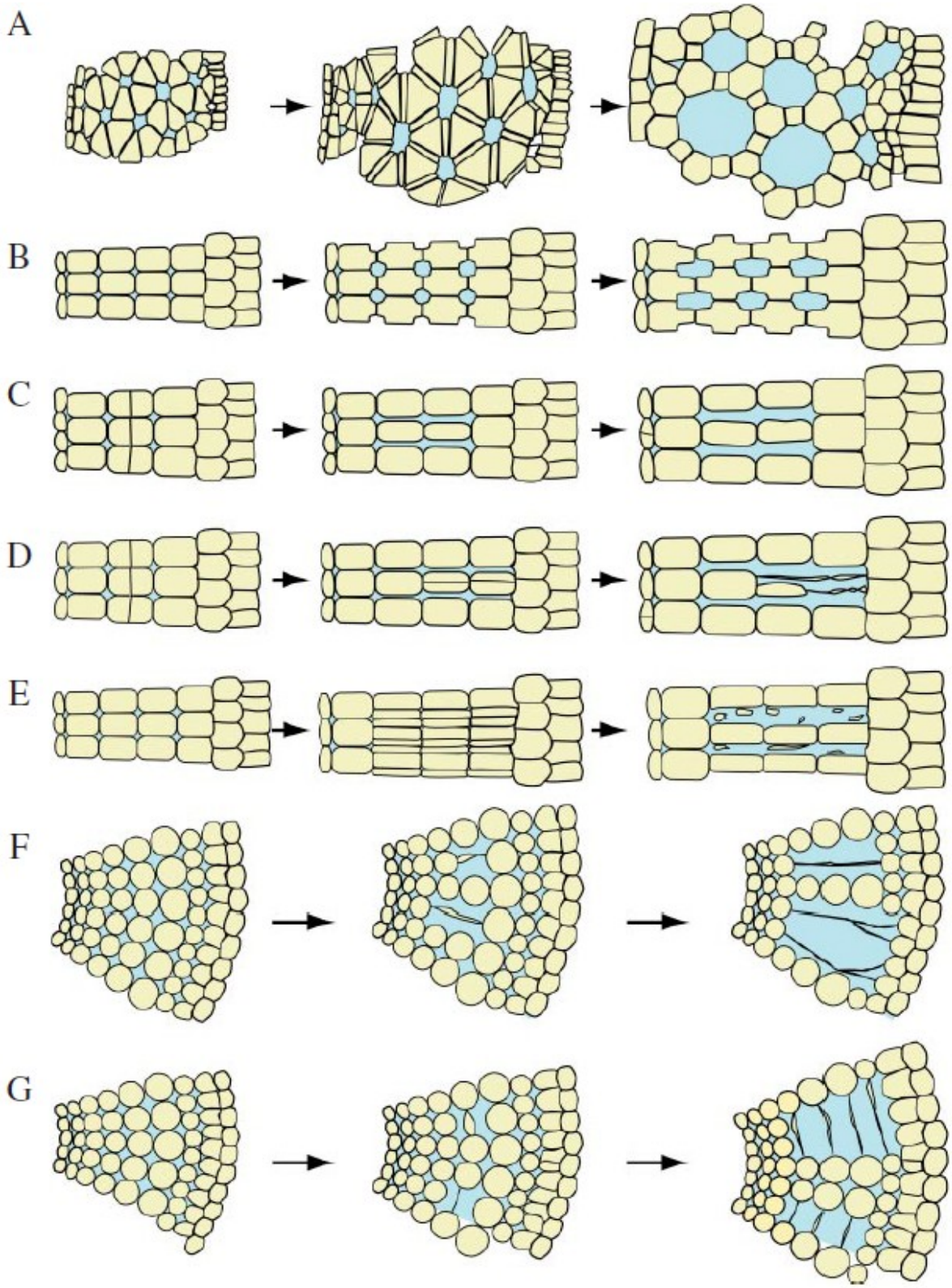
v hypoxických podmínkách vzrůstá (Drew 1997;Jackson and Armstrong 1999;Colmer and Voesenek 2009;Irfan et al. 2010).

V nedávné době byla studována úloha transkripčního faktoru *RAP2.2* z *Arabidopsis thaliana*, jenž je v kořenech syntetizován konstitutivně, v prýtu pak jen po indukci etylénem nebo tmou. Jeho exprese zvyšuje schopnost rostlin přežít v hypoxických podmínkách, ovlivňuje signální dráhy vedoucí k reakcím cukernému metabolismu, fermentaci a syntéze etylénu (Hinz et al. 2010).

Ani seberychlejší a sebeefektivnější metabolické změny neumožní rostlině přežít hypoxický stres po příliš dlouhou dobu. Dříve či později nastupuje vyčerpání energetických zásob, posun v konduktivitě kořenů v důsledku porušení iontových rovnováh a změn na membránách, ústící ve vadnutí zaplavených rostlin. A tak se u těch, jež jsou uvedeným podmínkám vystavovány častěji, vyvinuly různé únikové strategie. Jako obrana před ztrátou kyslíku a pronikání toxických produktů redoxních reakcí probíhajících v hypoxii v substrátu pravděpodobně slouží mj. podpokožkové vrstvy (hypodermis, exodermis) s buněčnými stěnami impregnovanými např. suberinem a kutinem (de Souza et al. 2009;Kotula et al. 2009;Soukup et al. 2007).

Významným evolučním výdobytkem na poli rostlinné anatomie je vznik aerenchymu, tedy pletiva s vysokým procentem intercelulár napomáhající výměně plynů mezi nadzemní a podzemní (tedy většinou zaplavenou) částí rostliny ($O_2$, $CO_2$, etylénu a $CH_4$), nadlehčující rostlinu ve vodě a navíc v pletivu snižující relativní množství buněk metabolizujících, tedy spotřebovávajících energii a zásobní látky (Drew 1997;Jackson and Armstrong 1999). Snížení metabolické aktivity v určité části rostliny je výhodné nejen v zaplaveném prostředí, ale i v případě, že je rostlina vystavena jiným stresům. Příkladem může být zvýšení tolerance k suchu u kukuřice s vysokým podílem kořenového aerenchymu ve srovnání s hybridem, u nějž je toto pletivo zastoupeno méně (Zhu et al. 2010).

Pletivo uvedených vlastností je popisováno již ve druhé polovině 19. stol. Schwannem a Schleidenem, pojem „aerenchyma“ pak zavádí Schenck v r. 1890 (Seago et al. 2005). I o mnoho později se ještě v odborné literatuře setkáváme se studiemi, jež používají pro aerenchym alternativní označení, jako např. v práci věnované anatomii a ultrastruktuře buněk kořenů rýže, kde se hovoří o „vzdušných prostorách“ a o „lakunách“, (Clark and Harris 1981). Až donedávna byl typ aerenchymu běžně řazen do jedné ze dvou kategorií, kterými byly aerenchym schizogenní (vzniklý rozestoupením buněk) a aerenchym lyzigenní (vzniklý odbouráním některých sousedních buněk), (Jackson and Armstrong 1999).

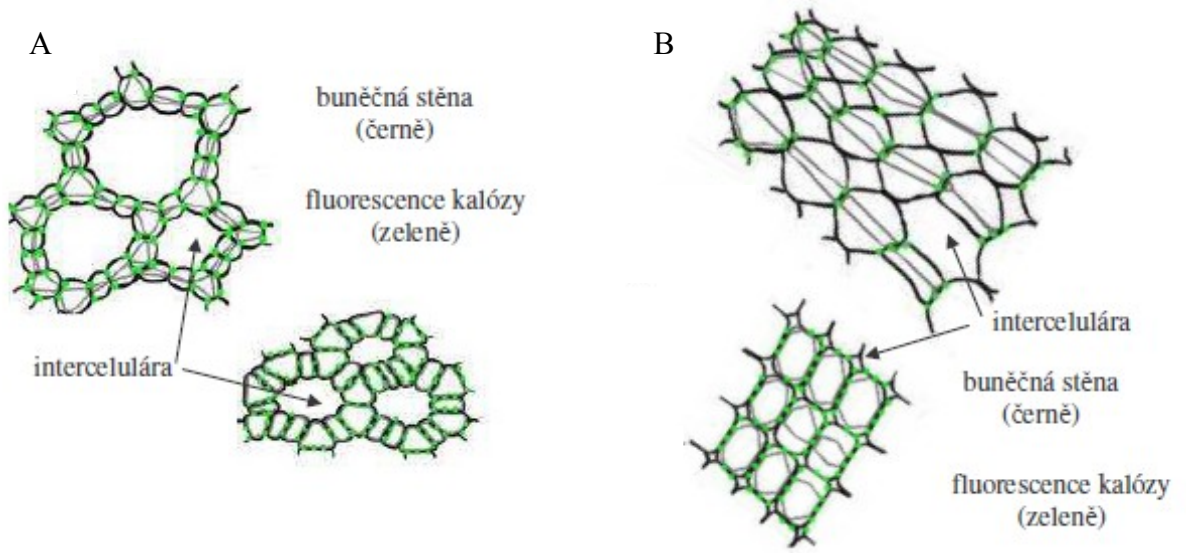



*Obr. 2.7. Grafické znázornění základních typů aerenchymu. Zachycen je vývoj od základního meristému po zralý aerenchym. A) expanzigenní aerenchym typu včelí plástve; B) radiální expanzigenní aerenchym; C) schizogenní aerenchym; D) schizo-lyzigenní aerenchym; E) lyzigenní aerenchym „balíčkového typu"; F) radiální lyzigenní aerenchym; G) tangenciální lyzigenní aerenchym. Interceluláry jsou vybarveny modře. (Seago et al. 2005).*

Seago et al. (2005) však klasifikaci upřesnili do podoby znázorněné na obr. 2.7, kde zásadní novinku představuje obr. A a B. Je zde naznačen vznik tzv. expanzigenního aerenchymu typu včelí plástve (A, např. leknín, *Nymphaea* nebo puškvorec, *Acorus*) nebo radiálního (B, např. vodní hyacint, *Eichhornia* nebo modráska, *Pontederia*), jenž vzniká jako důsledek specifického dělení a růstu některých kortikálních buněk, mezi nimiž potom vzniká rozsáhlá intercelulára, a to již velmi blízko kořenové špičce. Dále autoři potvrzují existenci schizogenního aerenchymu (např. u vrbovky, *Epilobium*), u lyzigenního aerenchymu rozlišují mezi aerenchymem radiálním (např. rákos, *Phragmites* nebo zblochan, *Glyceria*), tangenciálním (ostřice, *Carex*) a „balíčkovým“, angl. „packet“ (voďanka žabí, *Hydrocharis morsus-ranae*). Uvádějí rovněž, že aerenchym u některých rostlin nespadá ani do jedné z uvedených skupin a hovoří pak o „smíšeném“ aerenchymu, např. typu schizo-lyzigenního (orobinec, *Typha*). Některé mokřadní rostliny dokonce přežívají v zaplaveném prostředí, aniž by se s tvorbou aerenchymu „namáhaly“. Příkladem jsou rostliny masožravé, jako např. rosnatka, *Drosera*. Aerenchym expanzigenní je autory považován za jeden z nejpůvodnějších typů, neboť se nachází u rostlin z fylogeneticky starých řádů, jimž pravděpodobně propůjčil evoluční výhodu v zaplavených podmínkách.

Způsob vzniku aerenchymu a vzorec uspořádání buněk v jeho zralé podobě jsou korelovány s cytoplazmatickými spoji mezi sousedními buňkami. Zatímco u *Acorus calamus* se v průběhu vývoje primární kůry symplastické propojení nemění a zůstává zachováno v podstatě stejné uspořádání buněk jako v oblastech kořene blízkých kořenové špičce, u *Phragmites australis* se postupně uzavírají mezibuněčné spoje v radiálních stěnách a buňky zůstávají spojeny pouze napříč radiálními řadami, tedy svými tangenciálními stěnami. Lze zde uvažovat o souvislosti s transportem látek v určitém směru, jenž může být klíčový pro společný osud propojených buněk, viz obr. 2.8 (Vášková 2007).

-




*Obr. 2.8. Uspořádání kortikálních buněk, jejich plazmatických membrán po plazmolyzování buněk a symplastická propojení prezentovaná plazmodezmy ucpanými v průběhu fixace materiálu kalózou. A) Acorus calamus, B) Phragmites australis. Horní obrázky odpovídají pletivu ze starších částí kořene (aerenchym již zformovaný nebo formující se), dolní pletivo z mladších částí kořenů (Vášková 2007).*

---

Pohlížíme-li na aerenchym z jiného úhlu, můžeme hovořit o jeho dvou typech, a sice o aerenchymu konstitutivním a indukovaném. Ke vzniku konstitutivného aerenchymu dovedla mnohé vodní a mokřadní rostliny evoluce, díky čemuž se u nich tento proces stal součástí běžného vývoje (např. *Phragmites australis, Oryza sativa, Sagittaria lancifolia*). Druhý z uvedených typů aerenchymu je indukován působením aktuálních vnějších vlivů, především nedostatkem kyslíku v rhizosféře a akumulací produktů anaerobního metabolismu rostliny samotné i mikroorganismů sdílejících s ní stejné životní prostředí. Jako příklad rostliny, jejíž aerenchym spadá do této kategorie, bývá nejčastěji uváděna kukuřice setá, *Zea mays*,(Drew et al. 2000). Jedním z hlavních aktérů na cestě mezi sníženou koncentrací kyslíku v rhizosféře a tvorbou aerenchymu je ethylén, jehož vznik je podmíněn přítomností alespoň malého množství kyslíku, pročež uvedený proces nemůže probíhat v úplné anoxii (viz sekce 2.3.1). (He et al. 1996b;He et al. 1996a).

Historicky první zmínky o vzniku indukovaného aerenchymu u kukuřice a pšenice se pravděpodobně objevují v článku (Dunn 1921), kde jsou vznikající mezibuněčné prostory označovány jako „openings“, tedy v překladu do češtiny cosi jako „průhledy“. Uvedené

pletivo autorka nachází ve všech rostlinách pěstovaných v hydroponických kulturách, ale i v kultivacích z půdy a písku, kde však hraje roli roční období (více v diskusi).

Jako modelový organismus pro studium indukovaného aerenchymu bývá používána kukuřice setá, *Zea mays*. Kromě hypoxie, která dokáže zvýšit procentuální zastoupení aerenchymatických kanálů i v jiných rostlinách (*Spartina alterniflora*, *Triticum sp*., *Secale sp*.), podporuje tvorbu aerenchymatických kanálů v kořenech kukuřice i mechanický odpor nebo nedostatek živin (Malik et al. 2003;Evans 2004;Jiang et al. 2010;Wiedenroth and Erdmann 1985;Wiedenroth 1993;Beers 1997;Watkin et al. 1998;Drew et al. 2000;Maricle and Lee 2002;He et al. 1996a;He et al. 1996b;Jackson and Armstrong 1999;Bouranis et al. 2003;Bouranis et al. 2006).

Pro sledování tvorby aerenchymu u kukuřice bývá často používána její divoce rostoucí příbuzná, teosinte (*Zea nicaraguensis* nebo *Zea mays ssp. huehuetenangensis*), která tvoří aerenchym konstitutivně. Podařilo se identifikovat jeden z lokusů, které jsou za toto chování zodpovědné, a sice lokus Qaer1.05-6 na chromosomu I (Mano and Omori 2009).

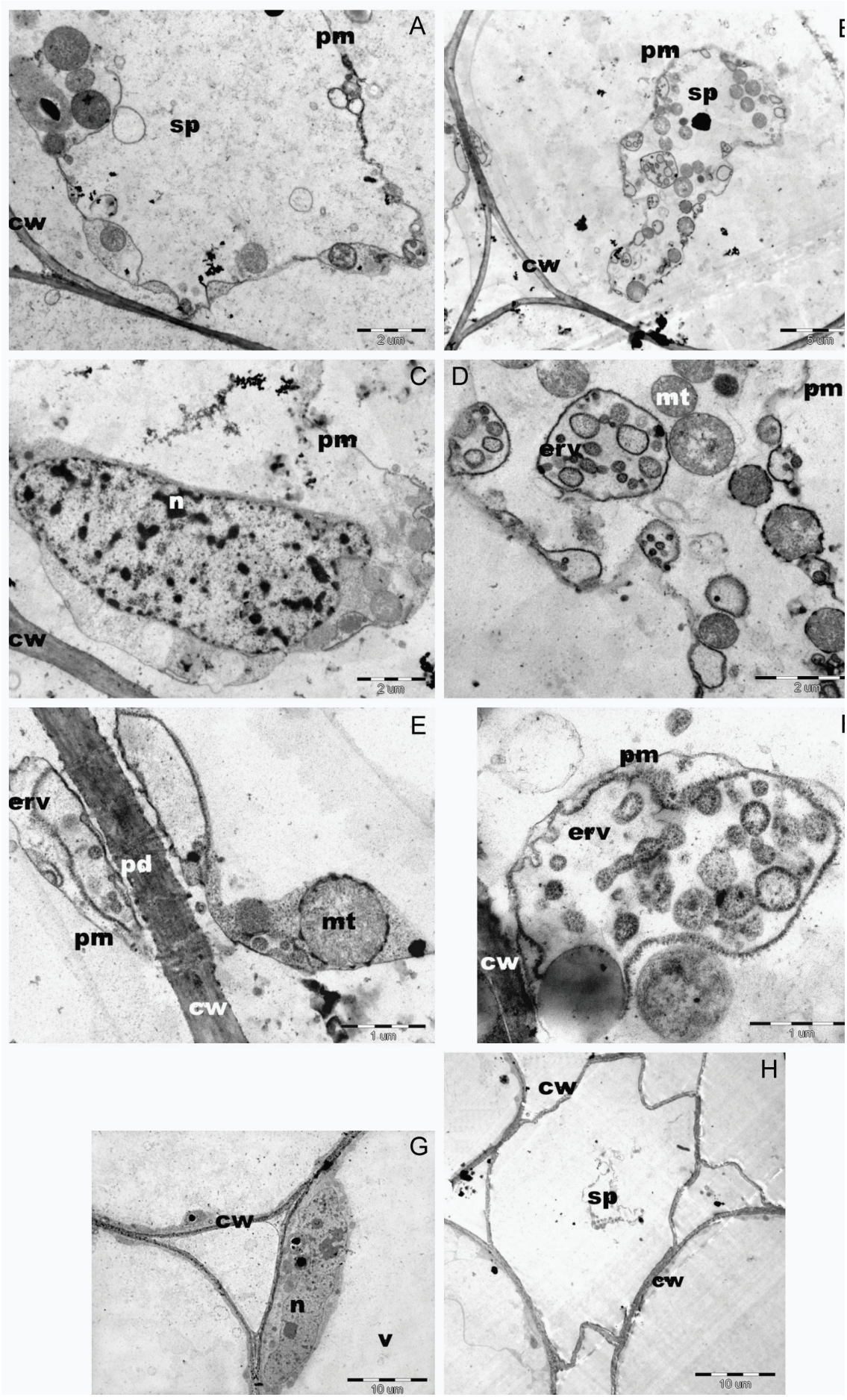
(de Souza et al. 2009) sledovali anatomicko-morfologické změny kořenů kukuřice pěstované a v několika následných cyklech selektované v polních podmínkách při opakovaném zaplavení. Jako důsledek tohoto umělého výběru získali rostliny odolnější k zaplavení díky větší ploše aerenchymu (ač ani kontrolní rostliny nebyly zcela prosté aerenchymatických kanálů), zúžení vrstvy primární kůry a relativnímu zvětšení středního válce s vodivými pletivy.

I rostliny, u nichž je vznik aerenchymu dán geneticky, mohou jeho tvorbou reflektovat na okolní podmínky. Příkladem může být rýže, která, pokud je pěstována v hypoxickém médiu, vytvoří aerenchym zaujímající větší plochu, než je tomu při běžné kultivaci. V anoxii je však množství aerenchymu v kořenech výrazně menší než v kontrolním případě. Na vině tu může být etylén, jehož tvorba je za uvedených podmínek blokována (D´Abundo 2003).

Evoluční význam konstitutivní formy aerenchymu pro život v zaplavení je dobře ilustrován na případu invazní lipnicovité rostliny *Spartina anglica,* která na východním pobřeží Severní Ameriky vytlačuje původní druh *Spartina alterniflora*, u níž je na rozdíl od prvního druhu vznik aerenchymu indukovaný, nikoli konstitutivní (Maricle and Lee 2002).

Tvorba indukovaného aerenchymu není dostatečná z hlediska dlouhodobé tolerance k zaplavení ani u pšenice (sledováno bylo několik kultivarů) ani u pšenično-žitného hybridu *Triticosecale* (Watkin et al. 1998).

Vznik aerenchymu může být kromě hypoxie podpořen např. i zvýšenou teplotou, deficiencí N a P, (Drew et al. 2000), ale i přebytkem dusíku, což by mohlo spolu s dalšími faktory vysvětlovat vymírání rákosin v eutrofizovaných vodách (Votrubová and Pecháčková 1996).
Vznik lyzigenního aerenchymu u kukuřice je považován za jeden z významných případů PCD, z výzkumného hlediska o to cennější, že je možné tento proces řízeně navodit (He et al. 1996a;Bouranis et al. 2006;Buckner et al. 1998;Gunawardena et al. 2001a;Gunawardena et al. 2001b).


A
pm
sp
cw
2 um
B
pm
sp
cw
5 um
C
pm
n
cw
2 um
D
mt
pm
erv
2 um
E
erv
pd
pm
mt
cw
1 um
I
pm
erv
cw
1 um
G
cw
n
v
10 um
H
cw
sp
cw
10 um

*Obr. 2.9. TEM snímky zachycující ultrastrukturní změny v kortikálních buňkách Zea mays, jež předcházejí rozpadu jejich buněčných stěn (A - F), neporušená buňka (G) a degradace buněčné stěny (H). 2 dny staré úseky kořenů z 8 dní starých rostlin pěstovaných v hydroponii (cw – buněčná stěna, erv – transportní váčky odvozené od endoplazmatického retikula, mt - mitochondrie, pd - plazmodezmy, pm – plazmatická membrána, n - jádro, sp – scvrklý protoplast, v - vakuola;. úsečky: A, C, D = 2 μm; B = 5 μm; E, F = 1 μm, G, H = 10 μm) (Lenochova et al. 2009).*

---

PCD při vzniku aerenchymu je charakterizována též ultrastrukturními změnami pozorovatelnými pomocí TEM (Campbell and Drew 1983;Gunawardena et al. 2001a;Gunawardena et al. 2004;Beers 1997;Schussler and Longstreth 2000;Gupta 2007),. Ačkoli podle Gunawardena *et al*. (2001a) v kořenech rostlin kukuřice vystavených působení hypoxie nebo etylénu se v kortikálních buňkách objevuje vchlipování plazmalemy, tvorba membránou obalených měchýřků i větších „apoptotických tělísek" odvozených od tonoplastu, jiná pozorování nasvědčují spíše tomu, že cytoplazma i organely jsou degradovány poté, co nastane porušení tonoplastu (Campbell and Drew 1983), případně jsou před tím uzavřeny ve váčcích, jejichž membrány pocházejí z plazmalemy nebo jiných buněčných organel (Lenochova et al. 2009). Podobný průběh je pak zachycen v práci sledující vznik listových perforací u „krajkové rostliny" *Aponogeton madagascariensis*, kde stejně jako při vzniku aerenchymu u kukuřice v umírajících buňkách byla zaznamenána pozitivní TUNEL reakce, ale stejně jako u (Lenochová et al. 2004b) se nepodařilo získat uspokojivé výsledky apoptotických žebříčků (Gunawardena et al. 2004) . Obdobné kroky jsou popisovány i u *Sagittaria lancifolia* (Schussler and Longstreth 2000), u níž však byly v další práci jedním z autorů výsledky přehodnoceny. Tito autoři pak aerenchym u *S. lanceolata*, stejně jako u *Thalia geniculata* a *Pontederia cordata*, označují jako typ schizogenní, v němž i silně deformované buňky, jejichž radiální stěny se vzájemně oddálily, zůstávají živé a zcela funkční (Longstreth and Borkhsenious 2000).

Pro studium vnitrobuněčných změn spojených se vznikem lyzigenního aerenchymu a jejich chronologického sledu je ideální znát předem umístění buněk, které mají být odbourány. V tomto ohledu je kukuřice coby modelový organismus poměrně nevhodná, neboť struktura její primární kůry poněkud postrádá řád. Vhodnějším kandidátem pro takový výzkum je rýže s přesně daným počtem vrstev kortikálních buněk i predikovatelností toho, ve které z nich začnou buňky odumírat jako první (Kawai et al. 1998). Obdobnou výhodu pro studium osudu kortikálních buněk by mohla nabízet i plovoucí rostlina voďanka žabí, *Hydrocharis morsus-*

*ranae* L, u níž je možné buňky, jež jsou předurčené k zániku, rozpoznat nejen na základě jejich pozice, ale i tvaru (Seago et al. 1999).

Kromě tvorby aerenchymu v již existujících zaplavených kořenech jsou některé rostliny (*Oryza sativa, Zea mays* nebo *Triticum sp.*) schopné na hypoxické podmínky či působení etylénu reagovat ještě další anatomicko-morfologickou modifikací. Jsou jí adventivní kořeny (viz výše), nezřídka navíc rovněž vybavené aerenchymatickými kanály (Mano et al. 2006;Mergemann and Sauter 2000;Watkin et al. 1998;Hlavatá 1992).

Kukuřice setá sama tvoří adventivní kořeny mnohem méně ochotně než její divoká příbuzná teosinte (*Zea mays ssp. huehuetenangensis*), která je díky této schopnosti úspěšnější v přežívání nepříznivých podmínek v podobě zaplavení, zvláště ve stádiu mladých klíčních rostlin. Pomocí křížení kukuřice seté s teosinte a následným výběrem rostlin tvořících větší množství adventivních kořenů bylo zjištěno, že geny zodpovědné za tento jev se nacházejí ve dvou lokusech, a sice na chromosomech 4 a 8, v obou případech pouze u teosinte. Tyto závěry poskytují potenciál pro budoucí šlechtění a modifikace kukuřice seté pro život ve stresových podmínkách (Mano et al. 2005). V dalším výzkumu pak autoři navíc zkoumali přítomnost aerenchymu v adventivních kořenech u kukuřice, teosinte a jejich kříženců a zjistili, že právě někteří kříženci stejně jako teosinte tvoří aerenchym v adventivních kořenech konstitutivně, i v odvodňované půdě, což ještě zvyšuje šanci na přežití daných rostlin v zaplavených podmínkách (Mano et al. 2006).

Prorůstání adventivních kořenů je provázeno smrtí epidermálních buněk v oblasti nodu, která je však zahájena ještě před tím, než k pokožce primordium dosáhne. Je pravděpodobné, že se jedná o smrt programovanou, bránící obranné reakci rostliny na mechanický stres v podobě protržení pokožky (Mergemann and Sauter 2000). Smrt epidermálních buněk je ovlivnitelná fytohormonálně – u rýže ji podporuje exogenně dodávaný analog etylénu (etefon) a kyselina giberelová, naopak inhibiční dopad má kyselina abscisová (Steffens 2005).

## 2.4. Mikroskopické metody využívané pro sledování buněčné smrti a jejího průběhu

Mezi klasické metody používané pro studium změn na úrovni buněčné a podbuněčné patří transmisní elektronová mikroskopie (např. (Gunawardena et al. 2001a;Gietl and Schmid 2001;Longstreth and Borkhsenious 2000), jejíž nespornou výhodou je vysoké užitečné zvětšení a fakt, že je pro tuto metodu možné připravit téměř jakékoli pletivo.

Fragmentace DNA, jeden z rysů charakteristických např. pro apoptózu, (avšak nejen pro ni, viz výše), (Bortner et al. 1995;De Jong A.J. et al. 2000), bývá často detekována pomocí tzv. TUNEL reakce. Ta pracuje na principu specifického navázání TdT (terminální deoxytransferáza) na 3´ OH konec DNA, čímž je spuštěna syntéza polydeoxynukleotidového polymeru s vestavěným označeným (biotin, dioxigenin) deoxyuridinem na místech zlomů DNA, případně je možná sekundární detekce takových nukleotidů pomocí fosfatáz, peroxidáz a chromogenních systémů (Ruzin 1999).

Při sledování PCD bývají hojně užívány i metody mapující integritu a viabilitu sledovaných buněk. Pro živočišné buňky a tkáně je to např. již zmíněný Annexin V, jenž však není vhodný pro rostlinný materiál, neboť kromě fosfatidyl serinu, který je v průběhu CD vystavován na povrch plazmalemy (van Engeland et al. 1998), se váže i na aldehydy-modifikované lipidy, které se v rostlinných pletivech mohou také vyskytovat (Samuilov et al. 2003).

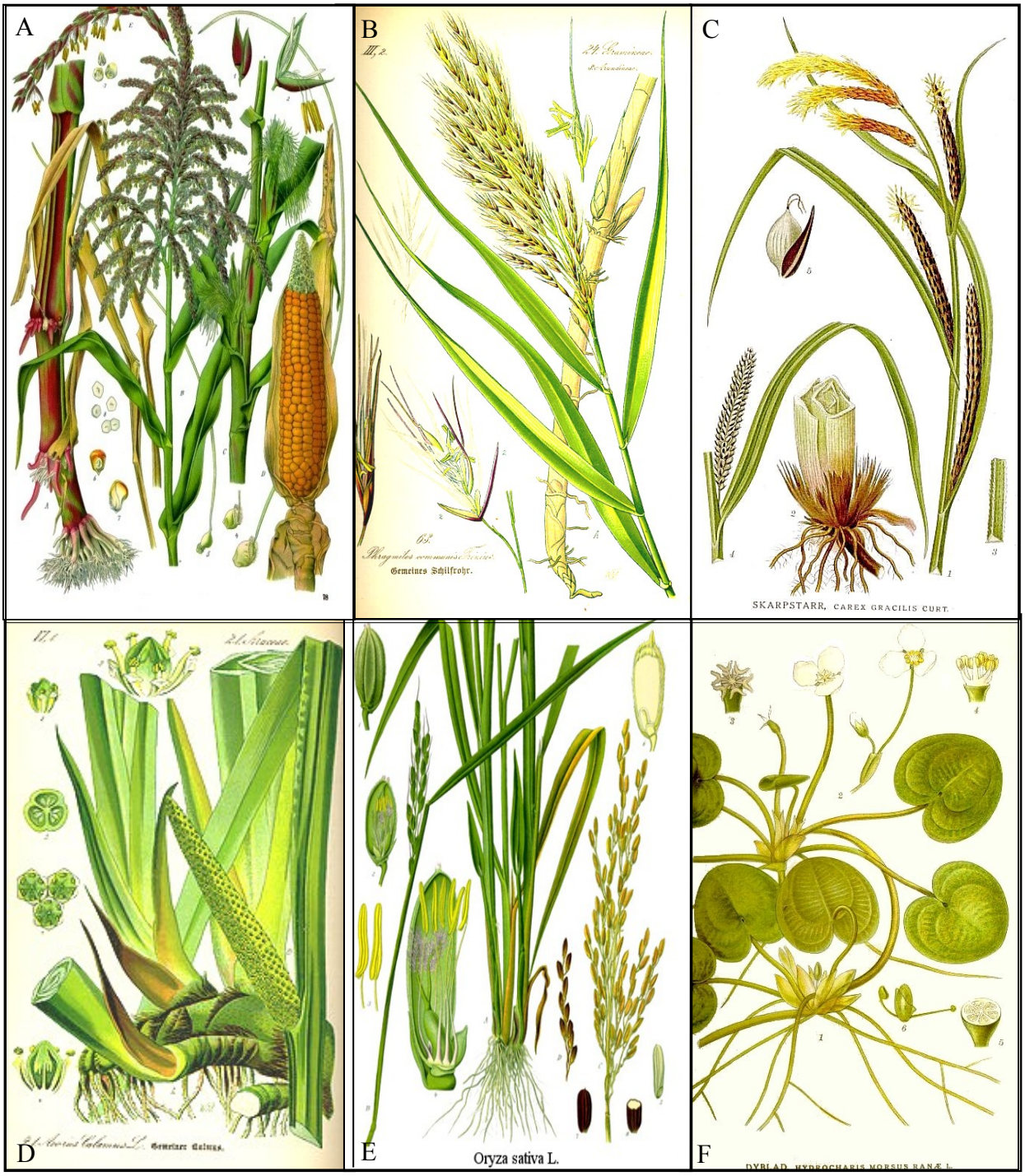
Klasickou metodou pro sledování buněčné viability je ošetření studovaných buněk fluorescein diacetátem (FDA), jenž se stává fluorescenčně aktivním pouze v buňkách s činnými esterázami, a tedy v buňkách živých. Navíc po odštěpení acetátových zbytků právě aktivitou esteráz získává náboj a zůstává uvězněn v buňce, do níž původně pronikl pasivně. Ukazuje se však, že lokalizace a distribuce fluorescenčně aktivního FDA se v průběhu vnitrobuněčných pochodů spojených s PCD mění. Jako doplňkové barvení pak bývá nejčastěji aplikován propidium iodid (PI), který proniká pouze přes porušené membrány a poté se váže na nukleové kyseliny. Obdobnou službu mohou vykonat i SYTO barviva, která do buňky pronikají bez ohledu na stav membrány, avšak jsou schopna se vázat pouze na neporušené nukleové kyseliny. Naopak akridinová oranž (AO) se váže na poškozenou DNA a fluorescenčně aktivní je mimo to i v prostředí s nízkým pH. Jako barviva pozorovatelná ve světlém poli bývají na buňky aplikovány toluidinová modř (TB), penetrující pouze do buněk s porušenými membránami, a neutrální červeň (NR), která získává svou karmínovou barvu v nízkém pH, což však může být v rostlinných buňkách vzhledem k jejich vysoké vakuolizaci a kyselé povaze vakuolární šťávy dvousečné (Kawai et al. 1998;Anonymous 2009;Smith et al. 1982;Obara et al. 2001;Kuriyama 1999;Dubrovsky et al. 2006).

# 3 MATERIÁL A METODY

## 3.1 Rostlinný materiál:

Hlavním rostlinným materiálem použitým ve většině pokusů byla kukuřice (*Zea mays*), kultivar Cefran. Pro anatomická srovnání byly dále sledovány i kultivary CE 240, Celio, CE 704, CE 1302, Celux 225, 2023, 2001, 2002, 2023, 2232, a 2023 × CE 704, sadbu všech dodala Oseva Bzenec, Česká Republika.

Jako zástupci typických mokřadních rostlin byly využity tyto rostliny: ostřice úzkolistá (*Carex gracilis*), rákos obecný (*Phragmites australis*), puškvorec obecný (*Acorus calamus*) – vše původně odebrané v třeboňských venkovních kultivacích BÚ AVČR – dále voďanka žabí (*Hydrocharis morsus ranae*) od firmy Agau Trade, ČR a rýže setá (*Oryza sativa*), kultivar Norin 36, dodaná společností The International Rice Genebank Collection, Manila, Filipíny, obr. 3.1.




*Obr. 3.1. A - Zea mays., B - Phragmites australis, C - Carex gracilis, D - Acorus calamus, E - Oryza sativa, F - Hydrocharis morsus-ranae; (wikipedia.org 2012).*

V některých pokusech byly pro srovnání a ověření metodiky jako biologicky uniformní a jednoduchý materiál využity buněčné kultury BY-2 v exponenciální fázi růstu, odvozené z rostlin tabáku viržinského (*Nicotiana tabacum* L., cv. Bright Yellow 2).

### 3.2 Kultivace:

Pro pokusné účely byla použita řada kultivačních postupů, daná varianta je vždy uvedena u výsledků každého experimentu.

Kultivace "mezi listy" – kukuřice a rýže:

Pro většinu pokusů byla kukuřice pěstována 3 - 7 dnů "mezi listy", obr. 3.2 – ve skleněných akváriích o objemu 5 l, kde byly obilky připevněny lepicí páskou mezi 2 listy filtračního papíru přiléhajícího ke stěnám akvária a zasahujícího do cca 3 cm vody nebo modifikovaného 25% Hoaglandova roztoku s mikroelementy (tab. 3.1.). Kolem kořenů klíčících rostlin vznikly v této kultivaci kanály se stěnami nasycenými roztokem, avšak eliminující negativní vlivy vodní kultury, jakými je např. nedostatek kyslíku v rhizosféře. Tento způsob pěstování byl výhodný mimo jiné i z hlediska určování stáří různých částí kořenů, neboť vzdálenost od obilky, do níž každý další den dorostla kořenová špička, mohla být značena lihovým fixem na stěny akvária.

| **složka** | **$Ca(NO_3)_2$** | **$KNO_3$** | **$KH_2PO_4$** | **$MgSO_4$** | **Fe citrát** |
|---|---|---|---|---|---|
| obsah (μM) | 1250 | 1260 | 250 | 250 | 10,2 |
| **složka** | **$H_3BO_3$** | **$MnCl_2$** | **$ZnSO_4$** | **$(NH_4)_2Mo_7O_{24}$** | **$CuSO_4$** |
| obsah (μM) | $57{,}7.10^{-3}$ | $178{,}6.10^{-3}$ | $2{,}9.10^{-3}$ | $0{,}16.10^{-3}$ | $0{,}62.10^{-3}$ |

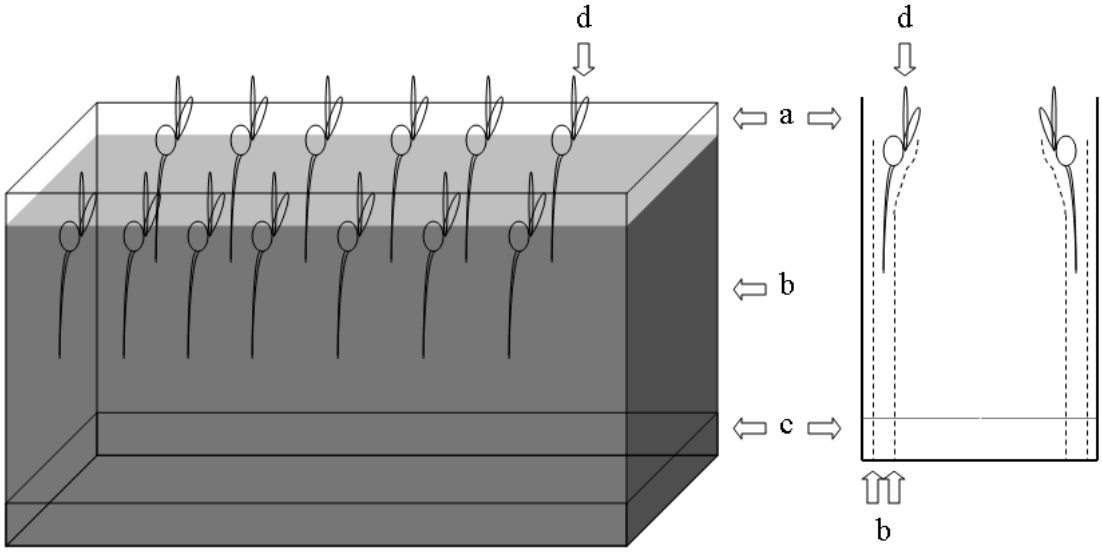
***Tab. 3.1.*** *Složení modifikovaného 0,25% Hoaglandova roztoku*

V některých případech byla do kultivačních roztoků přidána aminooxyoctová kyselina (AOA, 200 nebo 900 μM, *MP Biomedicals*, *MGP* Zlín, Česká republika) sloužící jako inhibitor syntézy etylénu (Peng et al. 2001). Kontrolní kultivace probíhaly v Hoaglandově roztoku nebo ve vodě. Jelikož

výsledky těchto dvou kontrolních kultivací byly obdobné, jsou uváděna pouze data získaná pěstováním ve vodě.

V pokusech, kdy byl sledován vliv světla na růst a anatomii rostlin kukuřice, byla některá akvária přikryta neprůsvitnými plastovými nádobami s ventilačními otvory.

Stejným způsobem byla po dobu 9 – 14 dnů pěstována i rýže setá.




*Obr. 3.2. Kultivace "mezi listy". Ve skleněném akváriu (a) byly mezi 2 listy filtračního papíru (b) přiléhajícího ke stěnám připevněny obilky kukuřice nebo rýže (d). Dno akvária bylo pokryto kultivačním roztokem (c), do něhož zasahoval filtrační papír, ale k němuž nedorostly kořeny.*

---

Kultivace v písku a perlitu - kukuřice:

Pro některé anatomické studie byla kukuřice pěstována v zaplaveném či vlhkém písku nebo perlitu. Rostliny byly po naklíčení umístěny po pěti do 0,75 l plastových květináčů a ponechány 7 dní ve skleníku, při vysoké vzdušné vlhkosti, fotoperiodě cca 15h a teplotách 21-28/20 °C, zálivce vodovodní vodou a přírodní ozářenosti.

Hydroponické kultivace - mokřadní rostliny:

Pro dlouhodobé kultivace většiny mokřadních rostlin bylo využito kultivační místnosti s konstatními podmínkami (fotoperioda 16 h, ozářenost 500 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, denní/noční teploty 25/18°C, relativní vzdušná vlhkost 60 %) v nádobách s provzdušňovaným v roztokem, který svým složením odpovídal složení pórových vod z eutrofních lokalit Třeboňské pánve (Steinbachova-Vojtiskova et al. 2006); tab.3.2.

| **Složka** | **$NH_4^+$** | **$NO_3^-$** | **$PO_4^{3-}$** | **$K^+$** | **$Ca^{2+}$** | **$Mg^{2+}$** | **$SO_4^{2-}$** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Obsah (μM) | 1317.9 | 1317.9 | 99.9 | 104.9 | 1099.2 | 390.67 | 390.67 |
| **Složka** | **$BO_3^{3-}$** | **$Fe^{2+}$** | **$Mn^{2+}$** | **$Zn^{2+}$** | **$Cu^{2-}$** | **$Mo_7O_{24}^{2-}$** | **$Cl^-$** |
| Obsah (μM) | 0.23 | 20.42 | 0.71 | 0.01 | 0.003 | 0.001 | 2198.3 |

***Tab. 3.2.*** *Složení živného roztoku použitého při kultivaci mokřadních rostlin*

Voďanka žabí byla ponechána ve venkovním jezírku Botanické zahrady UK v Praze v přirozených klimatických a světelných podmínkách měsíců května až září.

Kultivace buněčných suspenzí:

Kultivace buněčných kultur BY-2 probíhala podle (Nagata *et al.* 1992). Kromě kontrolních suspenzí byly pro studium PCD sledovány buňky vystavené po celou dobu kultivace chemickému stresu vyvolanému 50 μM $CdSO_4$ (Kuthanova et al. 2008).

### 3.3 Stáří a délky sledovaných kořenů, tloušťka ručních řezů:

Aby bylo možné určit stáří jednotlivých částí kořene, byly po naklíčení kukuřice určené pro hydroponické kultivace její primární kořeny označkovány vodě odolnou čínskou tuší (Indian Ink, 7470, Royal Talents, Holandsko) 5 mm od kořenové špičky. Poté, co barva lehce zaschla, byly

rostliny přeneseny do kultivačních nádob. Obdobné značení bylo prováděno každý další den kultivace podle (Gunawardena et al. 2001).

Všechny kořeny kukuřice byly řezány pomocí ručního mikrotomu a břitvy, případně pouze v ruce za použití ostré žiletky. Jejich tloušťka se pohybovala mezi 100 a 200 μm, v závislosti na tom, pro jakou metodu byly řezy určeny. Jejich další použití spočívalo v aplikaci TUNEL reakce, fluorescenčních i jiných mikroskopických testů viability a v měření plochy aerenchymu pomocí počítačové analýzy obrazu (viz dále).

Kořeny puškvorce a rákosu byly řezány ve vzdálenosti 3 a 6 cm od kořenové špičky a v oblasti kořenové báze. Řezy z kořenů ostřice, dlouhých 10 – 15 cm, byly získány z poloviny délky kořenů (počátek odumírání kortikálních buněk), tří čtvrtin délky a z kořenové báze. Řezy z kořenů rýže byly odebrány z oblasti staré jeden den (počátek tvorby aerenchymu), dva dny a z kořenové báze. Tloušťka příčných i podélných řezů z kořenů výše uvedených mokřadních rostlin se pohybovala mezi 150 a 200 μm. Délka kořenů voďanky nepřesahovala 3 cm, řezy byly prováděny po celé délce kořene a jejich tloušťka byla menší, asi 100 – 150 μm.

### 3.4 Měření parametrů kultivačních roztoků:

Hladina kyslíku a pH roztoku byly měřeny každý den pomocí elektrody Clarkova typu (Universal Meter MultiLine P4, množství kyslíku vyjádřeno v % maximálního nasycení).

### 3.5 Měření plochy aerenchymu na příčných řezech kořeny kukuřice seté:

Kořeny kukuřice, v nichž byla sledována tvorba aerenchymu a jeho množství, byly fixovány v 70% etanolu a následně příčně nařezány pomocí ručního mikrotomu a břitvy. Takto byly získány 150 - 200 μm silné řezy z oblasti kořenové báze, z oblasti vzdálené ¾ délky kořene od špičky a z poloviny kořene, případně z úseků kořene o známém stáří. Připravené preparáty byly sledovány pomocí mikroskopu *Olympus BX 51* (Olympus, Tokyo, Japonsko) a fotografovány digitálním fotoaparátem *Apogee alta U4000* (Apogee Instruments Inc., Roseville, Californie). Plocha aerenchymu ve zkoumaných řezech byla měřena pomocí obrazové analýzy *Lucia G* (*LIM*, Praha, Česká republika) a vyjádřena jako "zastoupení aerenchymu", tedy poměr mezi plochou lyzigenního aerenchymu a plochou primární kůry (nezahrnující endodermis a hypodermis, označovanou též jako mezodermis).

### 3.6 Sledování viability kortikálních buněk za použití Evansovy modři a neutrální červeně:

Fyziologický stav kortikálních buněk byl sledován na příčných i podélných řezech kořeny kukuřice pěstované "mezi listy". Řezy byly připraveny pomocí ručního mikrotomu a břitvy, jejich tloušťka se pohybovala v rozmezí 100 – 150 μm.

Barvení Evansovou modří (EB, 2,5%, 3 min) a neutrální červení (NR, 0,01% roztok v Tris HCl, 9 min) bývá využíváno jako metoda pro zjištění integrity plazmatické membrány a tonoplastu. Evansova modř proniká pouze do buněk s porušenou plazmalemou, neutrální červeň se barví dočervena v prostředí s nízkým pH, typicky v organelách, jakými jsou u živočišných buněk lyzosomy nebo v rostlinném materiálu vakuoly. Metodika byla modifikována podle (Kawai et al. 1998).

Obojí barvení probíhalo v mělkých miskách o objemu cca 200 μl, řezy v nich byly umístěny do nádobek se dnem tvořeným jemnou tkaninou, tedy jakýchsi "sítek".

### 3.7 Sledování viability kortikálních buněk za použití fluorescenčního barvení:

Jako další metody pro detekci fyziologického stavu kortikálních buněk byla aplikována rozličná fluorescenční barvení podélných i příčných řezů z kořenů kukuřice a mokřadních rostlin. Řezy byly pořizovány pomocí břitvy a ručního mikrotomu, jejich tloušťka činila 150 – 200 μm. Kukuřice pěstovaná "mezi listy" byla řezána v polovině a třech čtvrtinách délky kořene, přičemž stejné úseky z dalších rostlin byly fixovány rovněž pro TUNEL reakci, podobně jako u dalších rostlin (viz dále). Barvení probíhalo po dobu 10 – 30 min v sítkách v mělkým miskách o objemu cca 200 μl.

Použity byly tyto fluorescenčně aktivní látky od firmy Molecular Probes:

FDA (fluorescein diacetát):

Látka pronikající do buňky přes plazmaticku membránu bez problémů, v buňce činností aktivních esteráz po odštěpení octanových zbytků vyzařující pod modrým zářením o λ 494 nm zelené fluorescenční záření o λ 521 nm.

PI (propidium jodid):

Látka pronikající do buněk přes porušenou plazmatickou membránu, vážící se na DNA, pod zeleným zářením o λ 530 nm emitující červeno-oranžové fluorescenční záření o λ 625 nm.

SYTO 16:

Látka pronikající do všech buněk, vážící se na DNA, pod modrým zářením o λ 488 nm emitující zelené fluorescenční záření o λ 518 nm.

Akridinová oranž (AO):

Látka pronikající do všech buněk, vážící se na poškozenou DNA, kde po vystavení zelenému fluorescečnímu záření o λ 500 nm emituje oranžovou barvu o λ 625 nm. Obdobně se chová i v kyselém prostředí.

FM4-64:

Lipofilní látka značící plazmatickou membránu, do živých buněk proniká pouze prostřednictvím endocytózy, pak může být zabudována i do vnitrobuněčných membránových struktur. Po vystavení zelenému fluorescečnímu záření o λ 510 nm aemituje červeno-oranžovou barvu o λ 626 nm nm.

Výše uvedená barviva byla uchovávána v mrazicím boxu v zásobních roztocích (1 mg na 1 ml rozpouštědla – acetonu či DMSO, dle pokynů výrobce, v případě FM4-64 ředění 0,5 mg na 1 ml; SYTO 16 dodané přímo jako 1mM zásobní roztok v DMSO) a před použitím v různých kombinacích ředěna pufrem PBS na požadovanou koncentraci (do 1 ml PBS přidáno 10 µl PI, 4 µl FDA, 4 µl SYTO 16, 4 µl Acridin orange, 6 µl FM4-64).

Invertovaný konfokální mikroskop *Leica TCS SP2 s AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter;* specializované pracoviště PřF UK) byl využit k pozorování některých vzorků ošetřených uvedenými fluorescenčními barvivy nebo TMR-TUNEL a DAPI. Detaily viz popisky u jednotlivých obrázků v sekci Výsledky.

### 3.8 **TUNEL reakce (terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick-end labeling):**

TUNEL reakce je metoda používaná pro detekci zlomů a volných OH-konců v DNA, které vznikají při jejím štěpení charakteristickém především pro PCD. Postupně bylo vyzkoušeno několik verzí, pro kořenové řezy upravených podle Jones et al. (2001), Anonymous (2005) a Anonymous (2006).

1. fáze, shodná pro všechny varianty TUNEL reakce:

Asi jeden cm dlouhé úseky různě starých částí kořenů kukuřice a některých mokřadních rostlin byly po dobu jedné hodiny fixovány pod vakuem v 4% formaldehydu a přes noc v něm ponechány při laboratorní teplotě. Pomocí ostré žiletky byly připraveny příčné či podélné řezy silné 150 – 200 μm, které byly následně po dobu tří hodin permeovány prostřednictvím 1% Tritonu v 0,1% citrátu sodném a poté byly ošetřeny Proteinázou K (15 min, 37 °C, 20 $\mu l.ml^{-1}$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Řezy, které sloužily jako pozitivní kontrola, byly po dobu 15 min při 37 °C vystaveny působení DNázy I (10 $mg.ml^{-1}$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Následovaly kroky odlišné pro různé varianty.

Varianta TMR:

Při 37 °C byly řezy ošetřeny po dobu 1,5 h směsí TUNEL-enzymů (terminální deoxynukleotidyl transferáza, TdT) a značených deoxynukleotidyl-trifosfátů v poměru 1 : 9 (In Situ Cell Death Detection Kit TUNEL TMR red (tetramethyl rhodamin), Roche Diagnostic GmbH, Manheim, Německo). V některých pokusech byla enzymatická složka naředěna 20x pomocí pufru TUNEL Dilution Buffer (Roche Diagnostic GmbH, Manheim, Německo). Souběžně byla provedena negativní kontrola, v jejímž ošetření byl vynechán roztok TdT. Jádra v týchž řezech byla poté obarvena pomocí barviva Hoechst (7$\mu g.ml^{-1}$, 3 h, laboratorní teplota, temno; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) nebo DAPI (1 $\mu g.ml^{-1}$ PBS, 15 min, laboratorní teplota, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Po propláchnutí byly řezy pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem (TMR excitováno zářením 510-550 nm, DAPI 330-385 nm, emise v oblasti červené - 580 nm a modré - 461 nm). Použit byl, stejně jako v dalších variantách, mikroskop *Olympus BX 51* (Olympus, Tokyo, Japonsko) s kamerou *Apogee alta U4000* (Apogee Instruments Inc., Roseville, Californie).

Varianta AP-fluo:

Jako v předešlém případě byla použita směs TUNEL-enzymů (terminální deoxynukleotidyl transferáza, TdT) a deoxynukleotidyl-trifosfátů v poměru 1 : 9 (1,5 h, 37°C; In Situ Cell Death Detection Kit TUNEL AP, Roche Diagnostic GmbH, Manheim, Německo). V této variantě byly nukleotidy značené fluoresceinem (excitace modrým světlem při 450-480 nm, emise v zelené oblasti s maximem ve vlnové délce 521 nm). Jako v předchozím ošetření následovala aplikace

barviva DAPI a pozorování řezů pod tímtéž fluorescenčním mikroskopem, negativní kontrola proběhla obdobně jako v předešlém případě.

Varianta AP:

Řezy, které byly ošetřeny výše popsaným postupem "AP-fluo", byly dále pozorovány ve světlém poli nebo pod UV zářením (330 – 385 nm), pod nímž se TUNEL-pozitivní jádra jevila jako černá, zatímco ostatní jádra zářila díky barvivu DAPI jasně modře (emisní maximum 461 nm).

. Tomuto pozorování předcházelo vystavení účinkům alkalické fosfatázy konjugované s antifluoresceinovými protilátkami (30 min, 37 °C), následované 20-minutovým působením BCIP+NBT (BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; NBT: p-nitroblue tetrazolium chloride; MP Biomedicals). Aktivita nespecifických fosfatáz byla inhibována přidáním 50mM Levamisole hydrochloridu (MP Biomedicals).

Počítání TUNEL-pozitivních jader:

Ve všech výše uvedených případech byla jádra sčítána na fotografiích pomocí obrazové analýzy *Lucia G* (*LIM*, Praha, Česká republika) a jejich počet byl obvykle vyjádřen jako „zastoupení TUNEL-jader", tedy poměr mezi počtem TUNEL-pozitivních a všech jader ve střední oblasti primární kůry. Pro sledování distribuce TUNEL-pozitivních jader v primární kůře byla jádra sčítána v jednotlivých koncentrických buněčných vrstvách, přičemž jako první byla označena vrstva těsně sousedící s endodermis.

TUNEL reakce pro tabákové buněčné kultury:

TUNEL reakce pro buněčné suspenze BY-2 byla provedena podle (Jones et al. 2001) za použití TMR-red a FITC in situ cell death detection kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Německo). Výsledky získané pro FITC (fluorescein isothiocyanát) byly obdobné jako pro TMR a dále nejsou uvedeny. AP-TUNEL reakce se pro buněčné suspenze neosvědčila, její výsledky byly značně nekonzistentní a v práci nejsou uvedeny.

### 3.9 Statistické zhodnocení dat:

V experimentech určených pro statistické zpracování byly použity nejméně 3 kořeny, z každého pozorováno a vyhodnoceno nejméně 5 řezů, každý experiment byl opakován nejméně dvakrát. Všechny výsledky jsou uváděny pro $\alpha = 0,05$, zpracovány byly pomocí statistického programu NCSS 2000 (© Jerry Hintze, Kaysville, USA). Pokusy s buněčnými suspenzemi byly vyhodnoceny pouze semikvantitativně, bez aplikace statistických metod, pouze pro ověření výsledků získaných v pokusech s rostlinnými kořeny.

# 4 VÝSLEDKY:

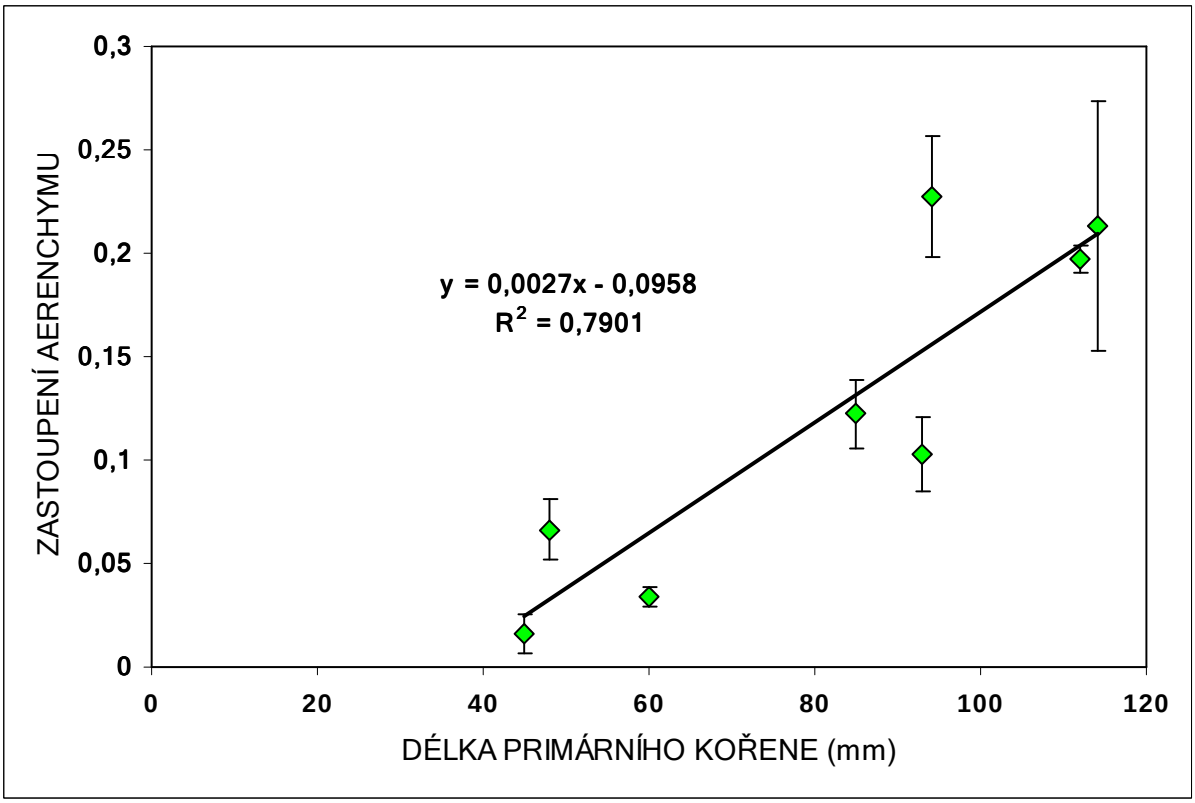
## 4.1 Vliv použitého kultivaru na tvorbu aerenchymu

Ve vlhkém perlitu byly pěstovány rostliny 12 kultivarů, množství aerenchymu pak bylo zjišťováno semikvantitativně na základě fotografií příčných řezů kořeny (tab. 4.1).

| Kultivar | celux225 | 2232 | 2023 | CE1302 | cefran | celio | 2001 | 2002 | CE240 | 2023 | CE704 | 2023xCE704 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zastoupení aerenchymu | *** | *** | ** | *** | *** | *** | ** | *** | ** | ** | ** | *** |

*Tab. 4.1. Tvorba aerenchymu v různých kultivarech kukuřice seté, pěstovaných ve vlhkém perlitu. Zastoupení aerenchymu v oblasti ¾ délky od kořenové špičky u sedmidenních rostlin bylo hodnoceno semikvantitativně. * = počátek tvorby aerenchymu, ** = méně než 25 % plochy primární kůry tvořeno aerenchymem, *** = aerenchym tvoří 25 a více % plochy, n =5*

U všech studovaných kultivarů byla sledována korelace mezi délkou kořene a zastoupením aerenchymu a u kultivaru Cefran při pěstování „mezi listy“ byla zjištěna statisticky průkazná regrese vyjadřující pozitivní závislost procentuálního zastoupení aerenchymu v primární kůře na délce kořene (obr. 4.1, Spearmanův koeficient $r$ = 0,67, $\alpha$ = 0,05, regresní koeficient = 0,0027, P< 0.005). V tomto případě byla plocha aerenchymu měřena pomocí obrazové analýzy fotografií příčných řezů kořenů.

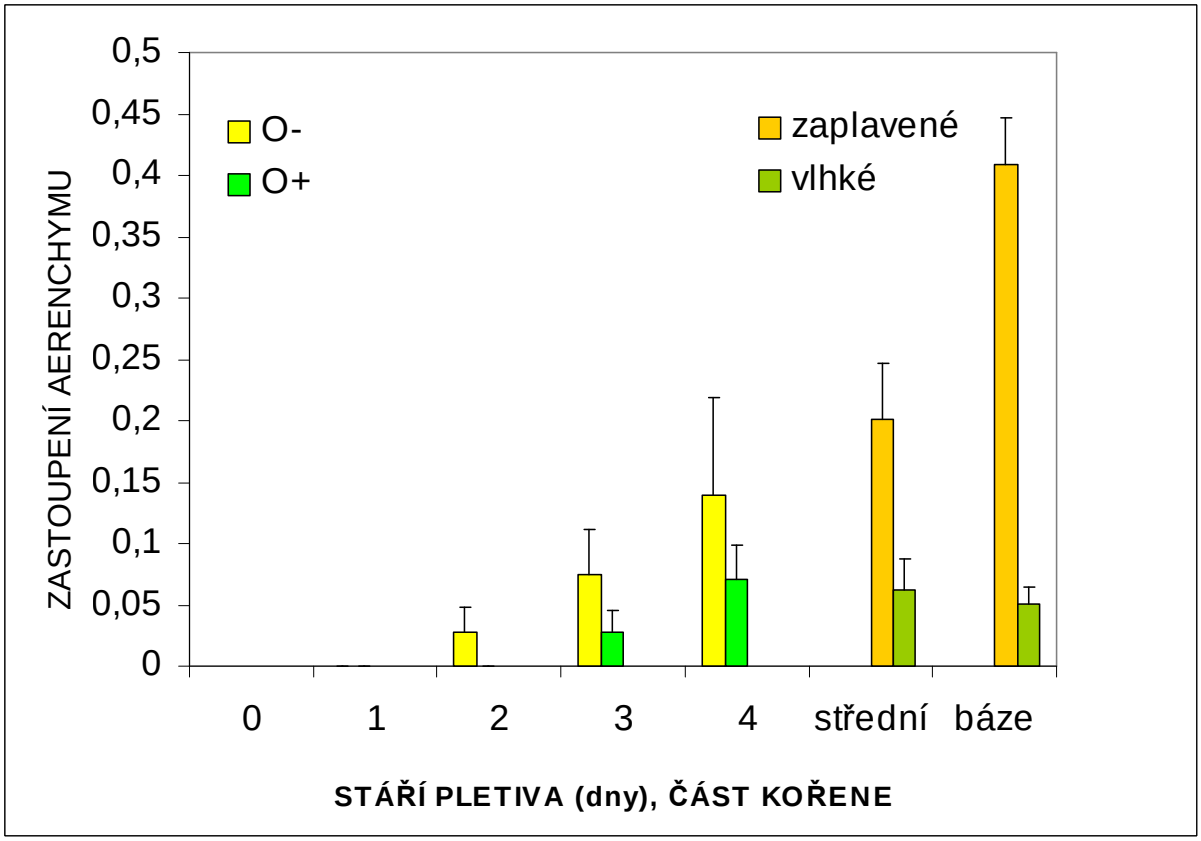



*Obr. 4.1. Korelace mezi délkou primárního kořene a zastoupením aerenchymu ve ¾ délky kořenů rostlin pěstovaných sedm dní „mezi listy“, n = 5, chybové úsečky označují SD.(Lenochova et al. 2009).*

## 4.2 Vliv použité kultivace na tvorbu aerenchymu

Pro většinu dalších kultivací a pokusů byl poté vybrán kultivar Cefran, jelikož jeho primární kůra měla nejpravidelnější stavbu. Pro zjištění vlivu kultivace na přítomnost aerenchymu v primární kůře kořenů byly tyto rostliny pěstovány v zaplaveném a vlhkém perlitu či písku a v kultivaci „mezi listy“.

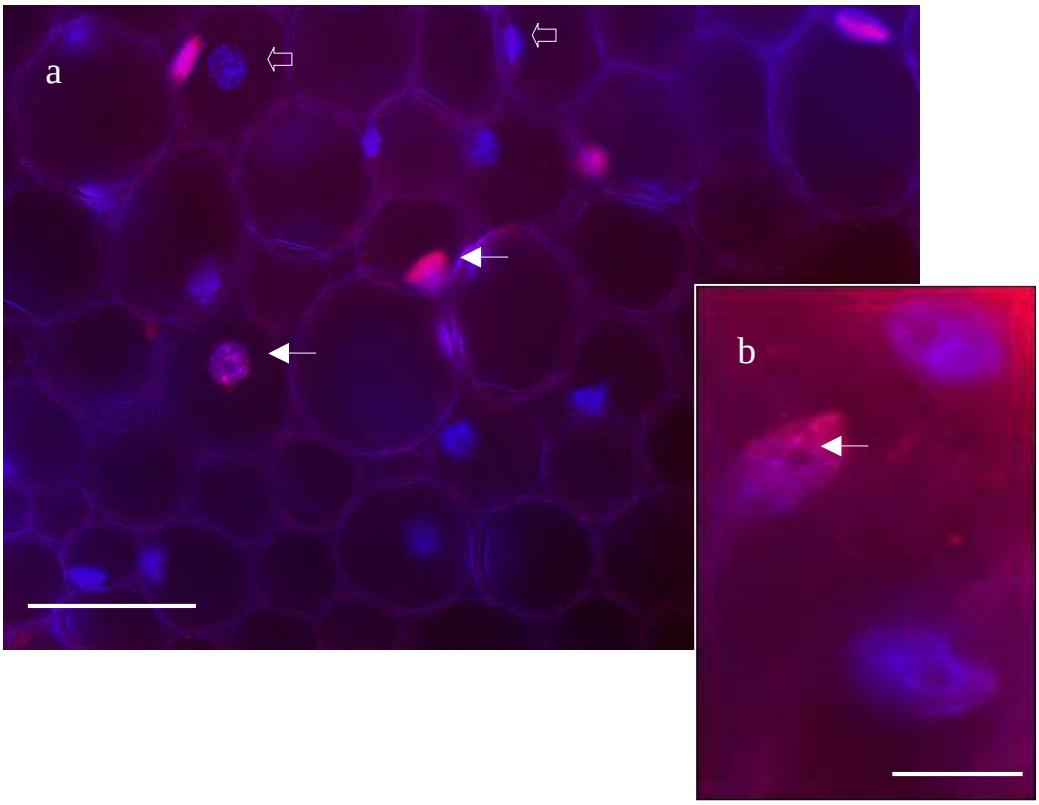
Aerenchym se tvořil v hypoxické i kontrolní (tedy nezaplavené) variantě. Vliv na množství aerenchymu mělo jak zaplavení, tak i vzdálenost sledovaného segmentu od kořenové špičky, a to včetně interakcí (ANOVA, P-level < 0,001), (obr. 4.2), (Lenochova et al. 2009).



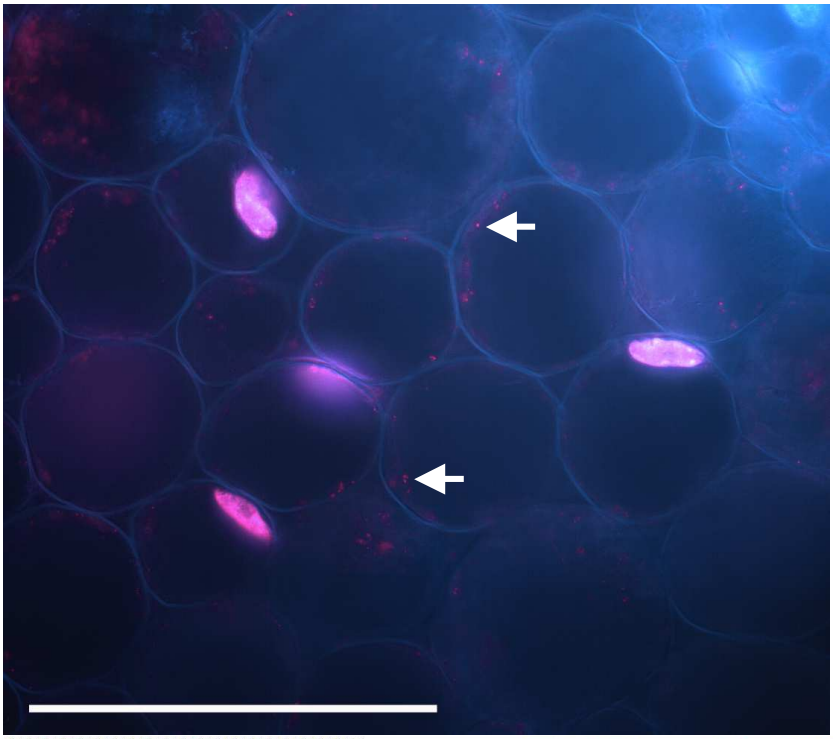

*Obr. 4.2. Zastoupení aerenchymu v primární kůře kořenů rostlin z hydroponické kultivace provzdušňované (O+) a neprovzdušňované (O-) a ze sedmidenní kultivace v zaplaveném a nezaplaveném perlitu; n = 5, chybové úsečky značí SD. Pro levou část grafu použita data z (Lenochová 2004).*

## 4.3 Optimalizace metody TUNEL

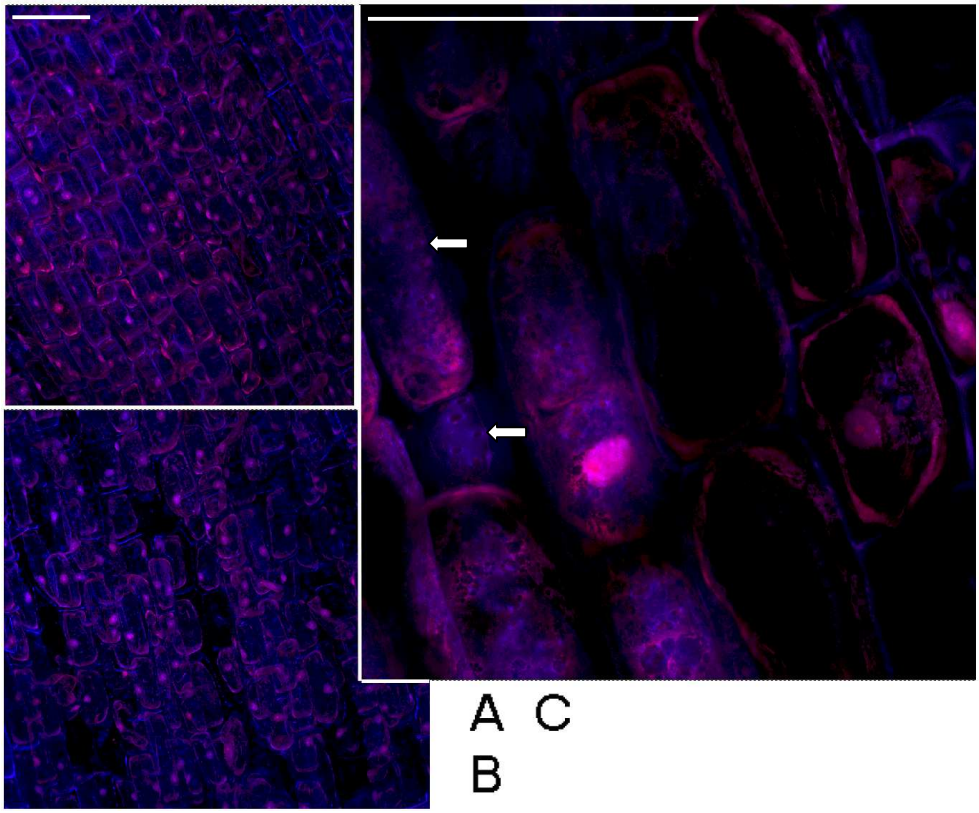
Pro průběh pokusů sledujících PCD v kořenech kukuřice byla zásadní optimalizace TUNEL reakce pro daný rostlinný materiál. TUNEL reakce je jako metoda pro důkaz PCD užívána dlouhodobě a mnohdy též výlučně, avšak jedná se o postup poměrně nespolehlivý, dávající mnohdy za použití stejného materiálu i chemikálií nekonzistentní výsledky, jak je možno pozorovat na obr. 4.3, 4.4 a 4.5. Zatímco v prvním případě se TUNEL-pozitivně barvila jen některá jádra (a to jak za použití TUNEL-TMR, viz obr. 4.3, tak TUNEL-FITC), výsledky z později prováděných experimentů za použití novější šarže chemikálií byly vysoce TUNEL-pozitivní, přičemž v podstatě všechna jádra ve všech ošetřeních vykazovala vysokou fluorescenci, a to slabě dokonce i v negativní kontrole, u níž byl vynechán roztok s enzymem TdT, obr. 4.4, 4.5.



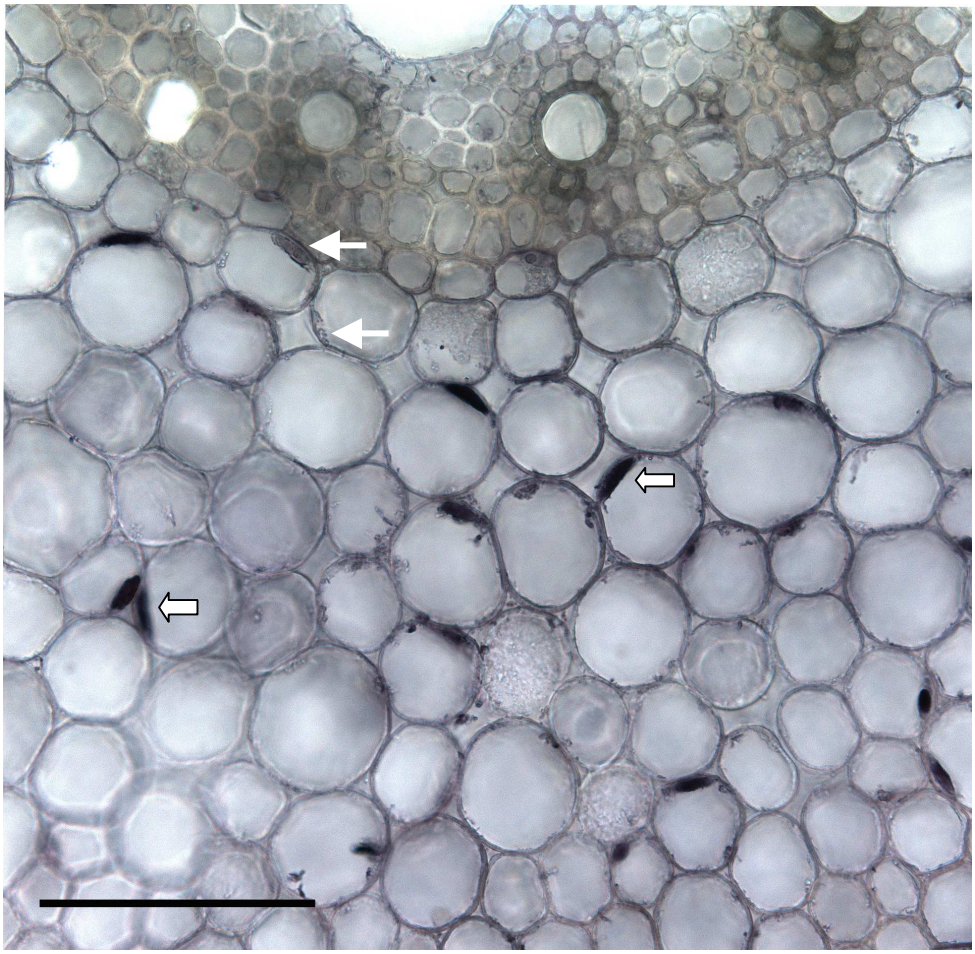

*Obr. 4.3 - Příčný řez kořenem naklíčené rostliny kukuřice seté, detail primární kůry, barvení pomocí Hoechst + TUNEL-TMR, složené snímky.*
*V buňkách primární kůry je možno vidět jednak jádra obarvená pouze pomocí barviva Hoechst (modrá jádra,⇐), jednak jádra, v nichž se skládá modrá a červená barva, tedy pozitivní značení jak pomocí Hoechst, tak i TMR (označená ←). V detailu (b) jsou patrná jadérka (←), naznačující, že jádra ještě nejsou zcela degradována, čemuž odpovídá i typický čočkovitý tvar jader. Úsečka = 25μm (a) nebo 5μm (b), (Lenochová 2004).*



*Obr. 4.4. Primární kůra příčného řezu ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. Jádra jsou značená prostřednictvím DAPI a TUNEL-TMR, oba snímky složené do jednoho. Všechna pozorovaná jádra vykazovala pozitivní TUNEL reakci, tedy červené zbarvení. Červené zbarvení se objevovalo i na dalším buněčném materiálu, pravděpodobně membránového původu (🡐). Úsečka = 100 µm.*

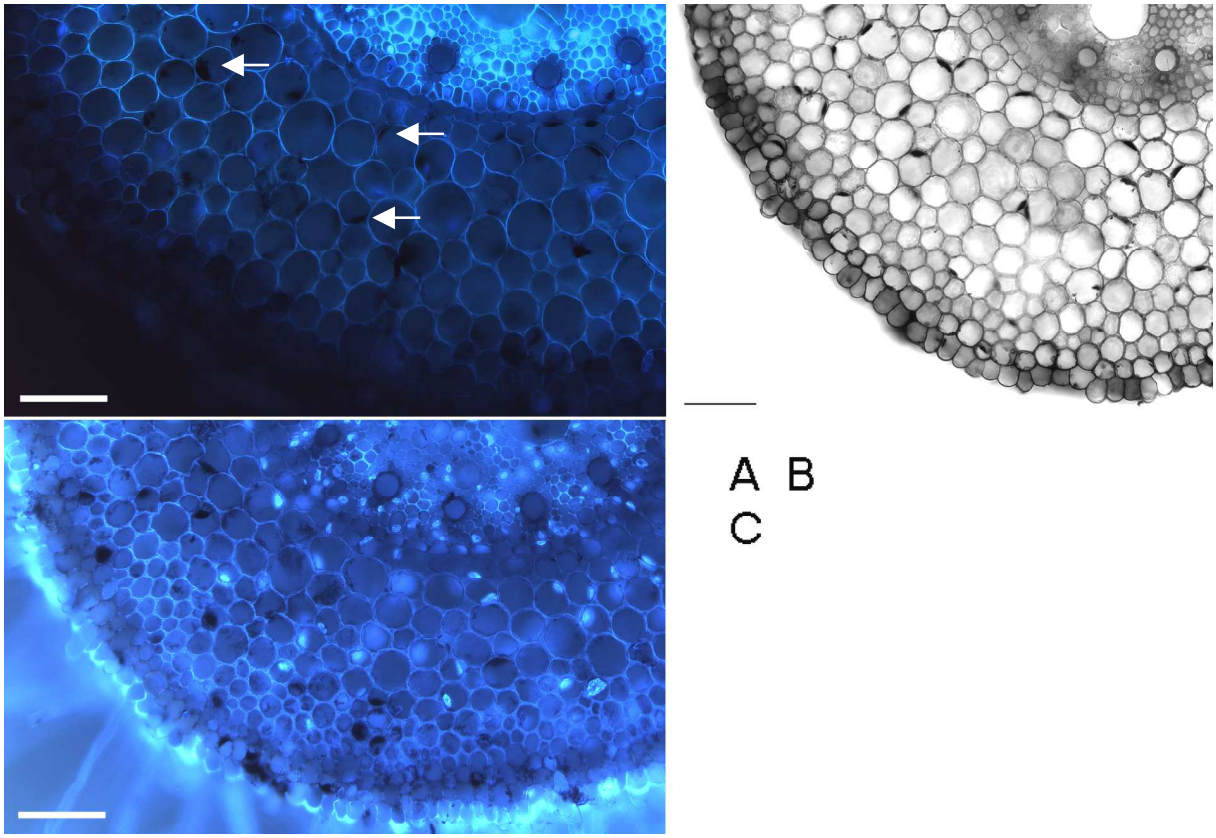



*Obr. 4.5. Podélné řezy primární kůrou na bázi (B) a ve ¾ délky (A, C) kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. Kořeny byly barvené pomocí TUNEL-TMR (červená barva) a DAPI (modrá barva), pozorovány byly pomocí konfokálního mikroskopu při vlnový délkách 405 a 543 nm, s emisemi 409 – 488 nm a 560 – 652 nm. Obr. složený ze 112 optických rovin snímaných s rozestupem 0,65 µm. Kromě všech jader byly TUNEL-TMR obarvené i plazmatické membrány, na nich je patrná mírná plazmolýza ošetřeného materiálu. Modrá je autofluorescence buněčných stěn, na nich jsou pozorovatelná primární políčka (⇦). Úsečka = 100 µm.*

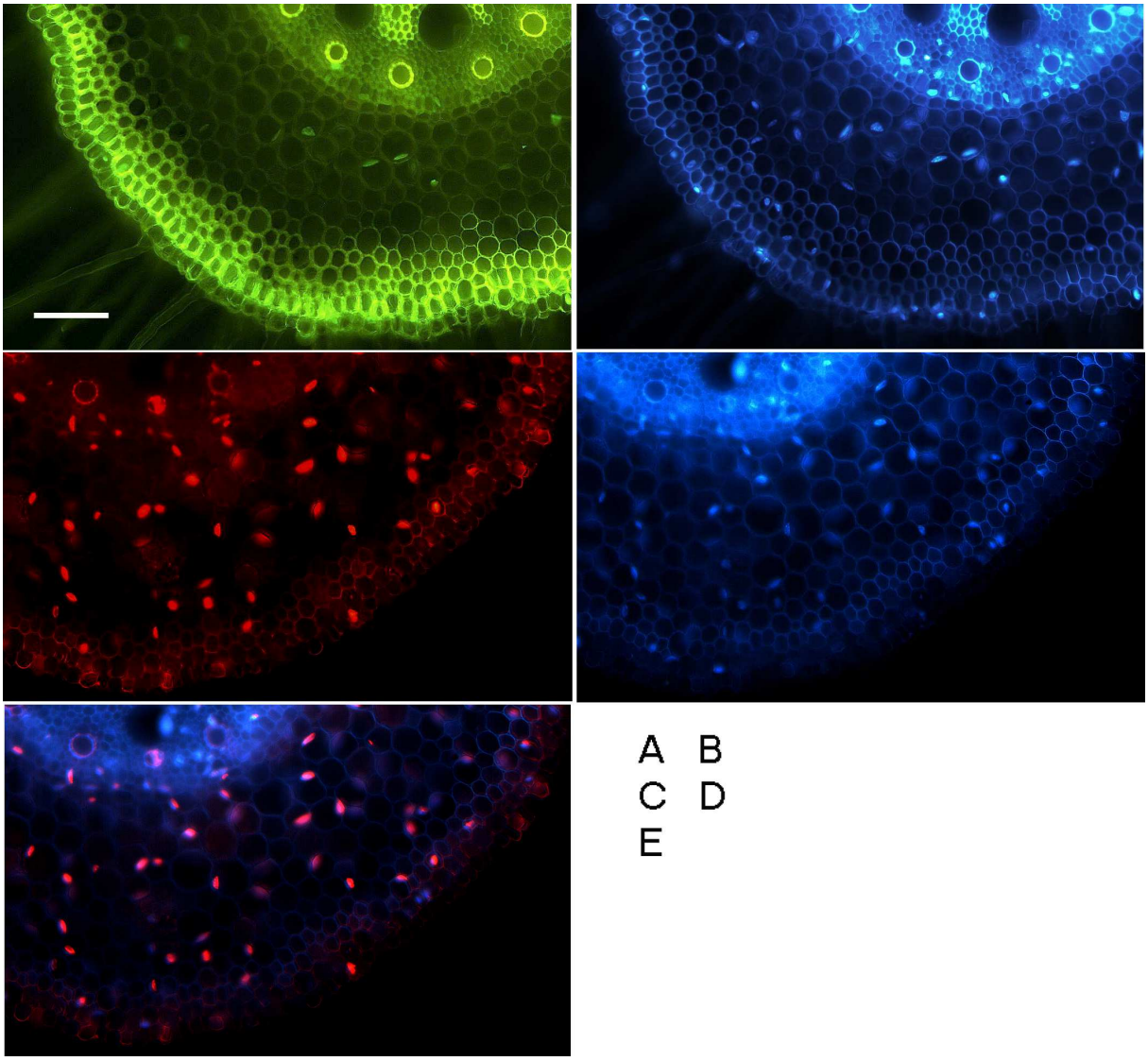


*Obr. 4.6. Primární kůra na příčném řezu ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. Jádra označená (⇦) a neoznačená (←) prostřednictvím TUNEL_AP, sledováno ve světlém poli. Úsečka = 100 µm*

Vzhledem k tomu, že příčinou mohla být autofluorescence rostlinného materiálu, byla dále testována metoda využívající TUNEL-AP, kde jsou TUNEL-pozitivní jádra zpravidla sledována ve světlém poli, čímž je možné vyhnout se riziku chybné interpretace autofluorescence pozadí sledovaného materiálu (obr. 4.6, 4.7). Jako použitelné se ukázalo i pozorování těchto vzorků pod UV světlem fluorescenčního mikroskopu, kdy se jádra obarvená DAPI jevila modře, zatímco jádra označená TUNEL-AP zůstala černá a tím patrná proti slabé autofluorescenci okolního pletiva. Různé typy použitých TUNEL reakcí a jejich vizualizací viz obr. 4.8.




*Obr. 4.7. Primární kůra příčných řezů ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. Řezy jsou obarvené TUNEL-AP (jádra = tmavé body, ←) a DAPI (jádra = světle modré body), A) a C) sledované pod UV zářením, B) ve světlém poli. V případě C) byl použit 20x ředěný roztok enzymů. Úsečka = 100 μm.*




*Obr. 4.8. Primární kůra na příčných řezech ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. A, B - řezy značené TUNEL_AP (sledované pod červenou fluorescencí, varianta AP_fluo; A) a DAPI (B). C, D, E - řezy značené TUNEL-TMR (C) a DAPI (D), snímky jsou složené do jednoho, překrytí modrých a červených jader dává ve výsledku fialové zbarvení (E). Úsečka = 100 μm.*

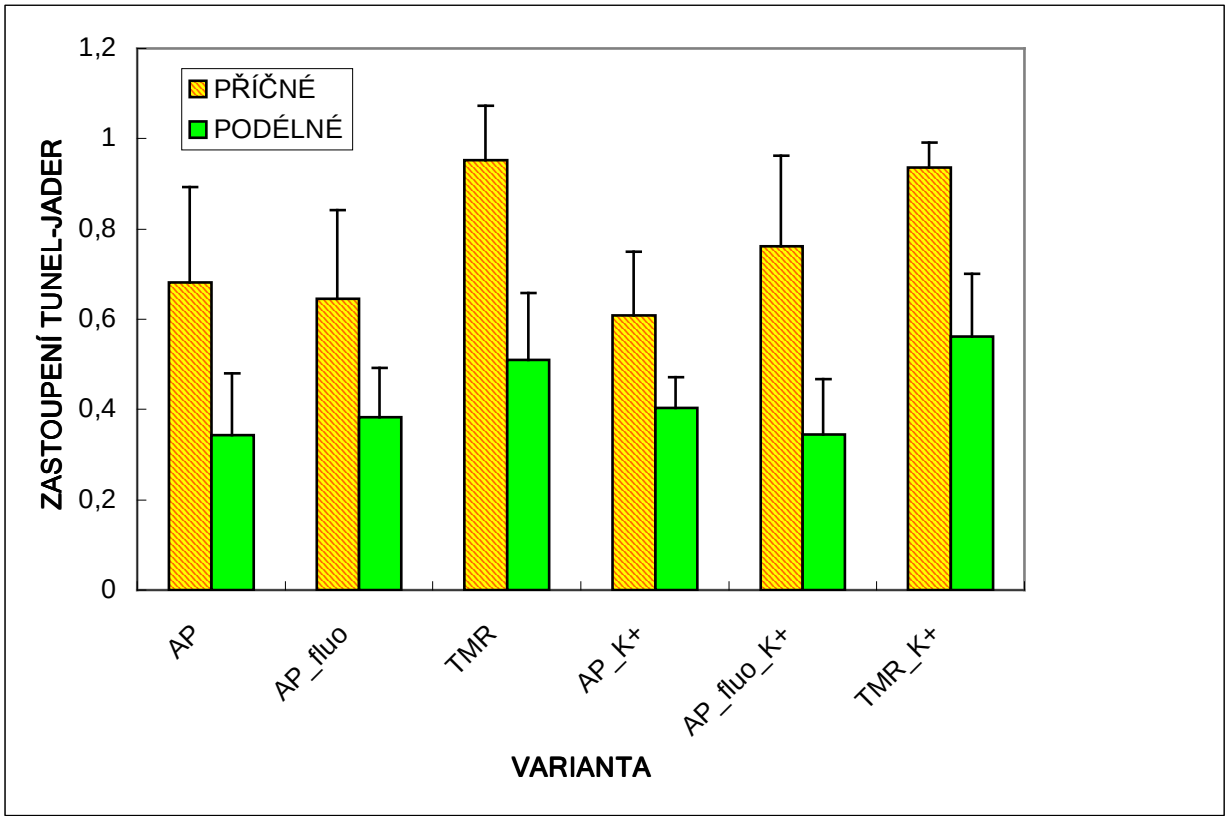
---

**Nespecifické značení prostřednictvím TUNEL reakce:**

Postupně byly vyzkoušeny různé verze TUNEL-směsí i způsoby vizualizace na příčných řezech kořeny (obr. 4.9), přičemž byly zjištěny mezi jednotlivými reakcemi signifikantní rozdíly. TUNEL-TMR se lišil od TUNEL-AP pozorovaného pod fluorescencí (AP_fluo) i po navázání AP (AP). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí GLM ANOVA, nested design a Tukey-Kramerův MCT, n = 18, 19 and 21, P-level < 0,001, $\alpha$ = 0,01. Ani jedno ze

zmíněných ošetření se všaknelišilo od své pozitivní kontroly (K+), což budilo podezření, že reakce není příliš specifická (dvouvýběrové T-testy, P = 0,41, 0,13 a 0,68, n (K+) = 9, 12 a 9). Příčné řezy viz obr. 4.10.

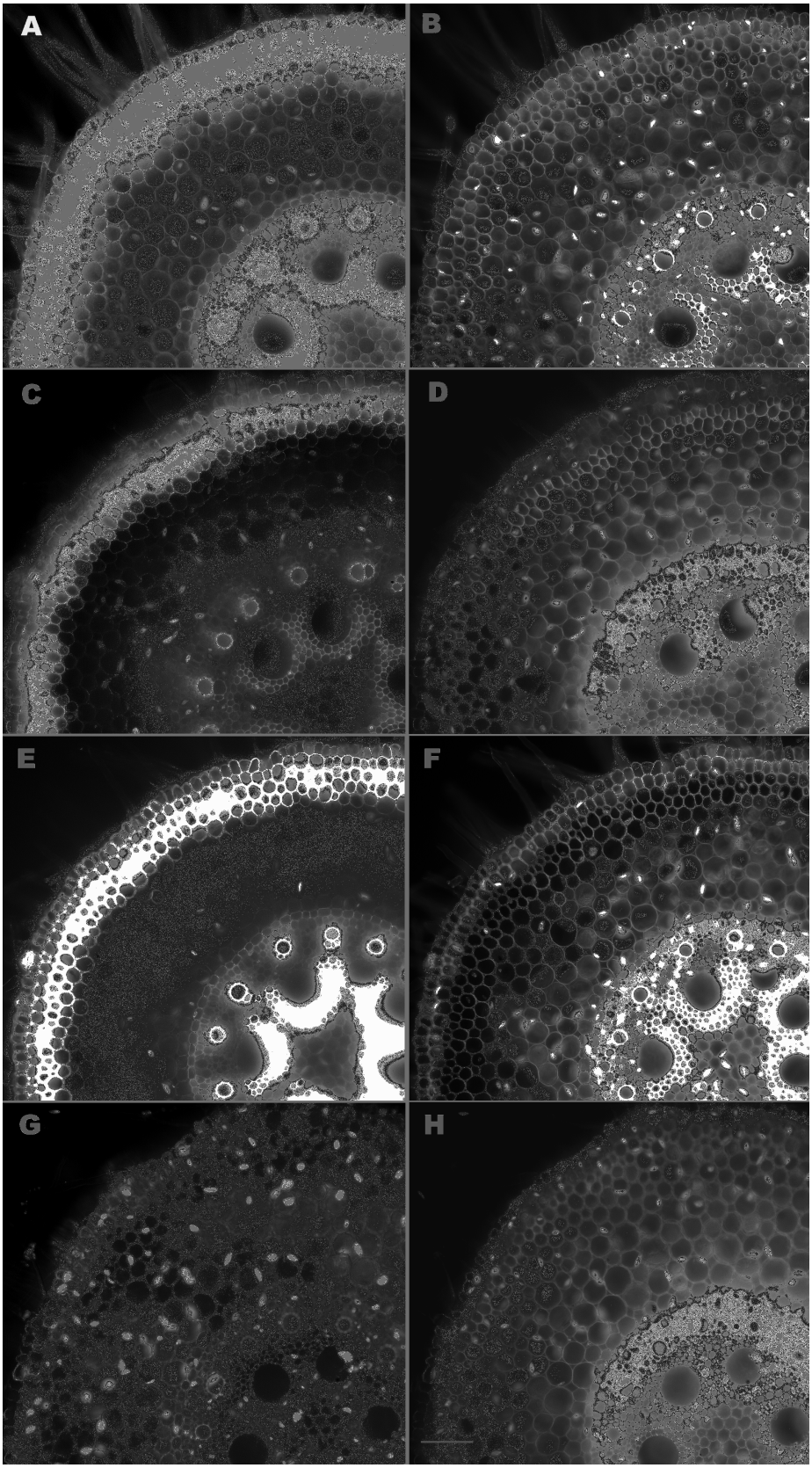
Když byly srovnávány podélné řezy, jednotlivé varianty se od sebe nelišily (ANOVA, n = 9, P-level = 0,19, $\alpha = 0,01$).



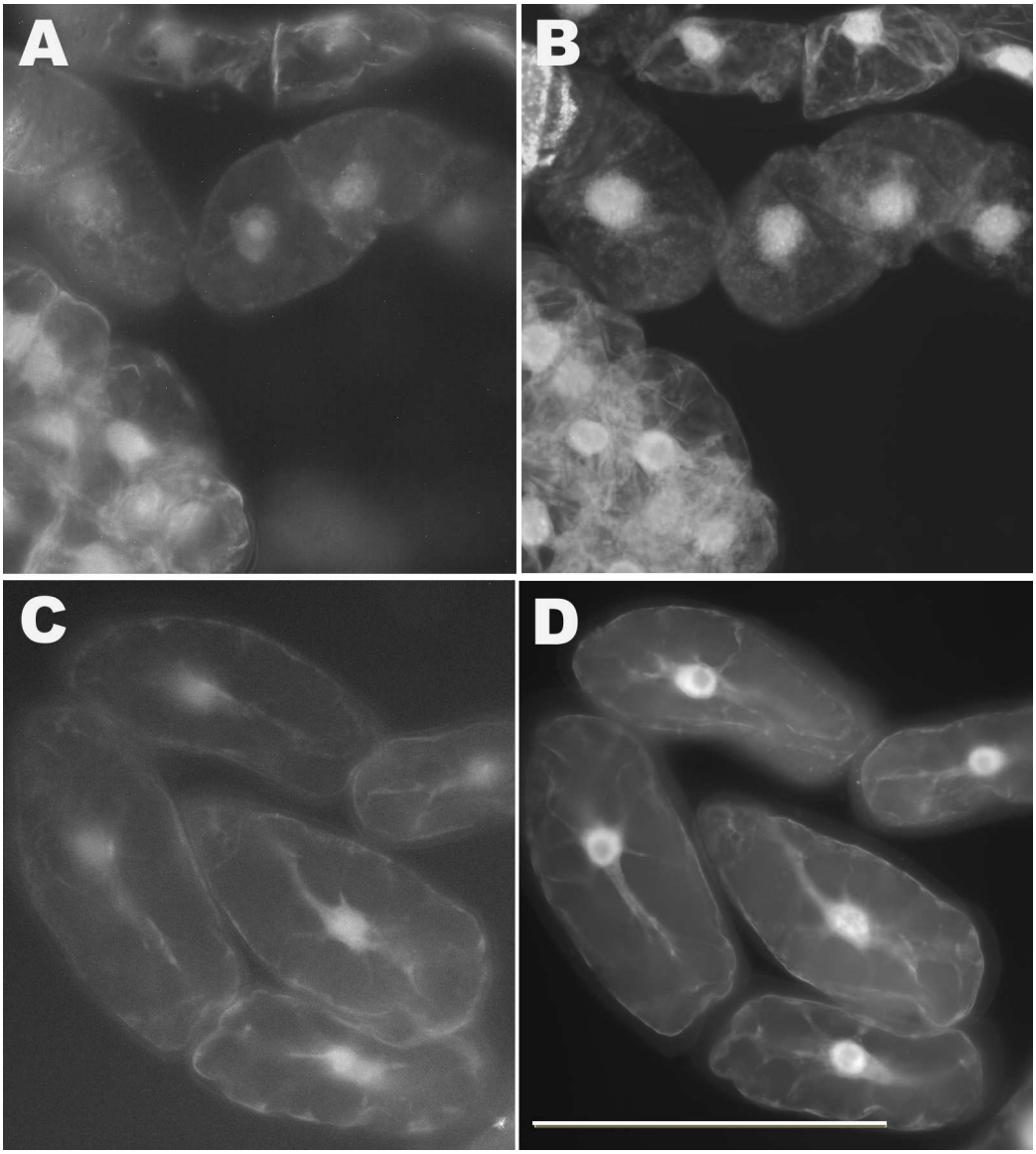

*Obr. 4.9 – Poměrné zastoupení TUNEL-pozitivních jader v různě připravených preparátech příčných a podélných řezů kořeny 3 dny starých rostlin. Řezy byly ošetřeny DAPI a různými procedurami TUNEL. AP = TUNEL-AP, AP_fluo = TUNEL-AP sledované pod fluorescencí, TMR = TUNEL-TMR, K+ = pozitivní kontrola. Průměrné hodnoty ± SD. n = 9 až 21*

---

Podobně ani při pokusech s TMR (ani FITC, data neuvedena) na buněčných suspenzích tabákových BY-2 buněk stresovaných 50μM kadmiem nebylo možné odlišit TUNEL-pozitivní jádra od jader s nespecifickou fluorescencí na pozadí, která se vyskytovala i v kontrolních, nestresovaných buňkách (obr. 4.11).




*Obr. 4.10. Příčné řezy kořeny 3 dny starých rostlin kukuřice pěstovaných "mezi listy" značené pomocí TUNEL (obr. v levém sloupci) a DAPI (pravý sloupec). A) AP_fluo-TUNEL, C) TMR-TUNEL, E) TMR-TUNEL, 20x ředěný enzymatický roztok, G) TMR-TUNEL, pozitivní kontrola, B, D, F, H – DAPI značení týchž řezů jako v A, C, E, G. Úsečka = 100 μm*



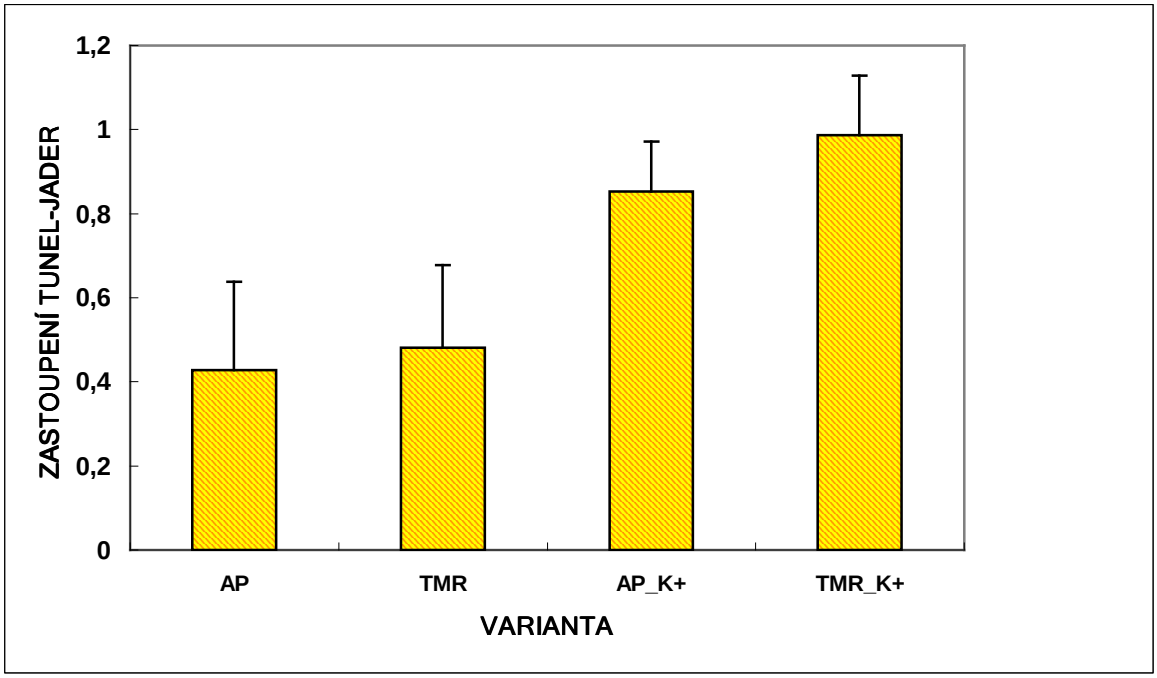

*Obr. 4.11. Buňky tabákové suspenze BY-2 značené pomocí TUNEL a DAPI. A) TMR-TUNEL na buňkách stresovaných při kultivaci 50 μM Cd , C) TMR-TUNEL na nestresovaných kontrolních buňkách, B), D) = značení pomocí DAPI, tytéž buňky jako v A) a C). Úsečka = 100 μm.*

---

Ačkoli tedy v AP-verzi byl počet TUNEL-pozitivních jader ve srovnání s TMR nižší, ani tyto výsledky se signifikantně nelišily od své pozitivní kontroly, zatímco od negativní kontroly ano. Jiné výsledky nebyly získány ani v případě, kdy byly z procedury vyřazeny či modifikovány všechny kroky, které mohly potenciálně způsobit přítomnost falešně pozitivních výsledků v důsledku naštípání DNA. Takovými činiteli by teoreticky mohly být

např. kyselé fixáže (Anonymous 2006), příliš dlouhá doba působení některých chemikálií (Triton, všechny enzymy), vyšší teploty v průběhu procesu apod.

Uspokojivé výsledky přineslo až dvacetinásobné naředění roztoku s enzymy, kdy jak AP-, tak TMR-verze vykazovala na příčných řezech signifikantně nižší počet TUNEL-pozitivních jader než pozitivní kontroly. Vzájemně se od sebe tyto varianty nelišily (GLM ANOVA a Tukey-Kramerův MCT, nested design, P< 0,001, n = 16, 17, 9 a 9; obr. 4.12).

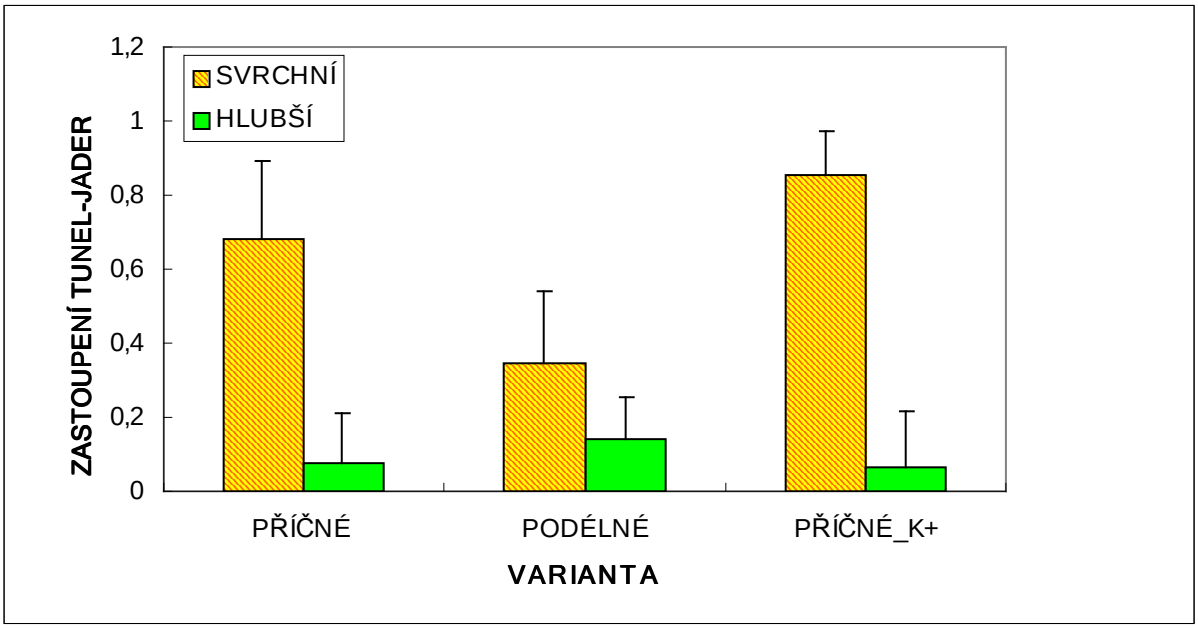



*Obr. 4.12. Zastoupení TUNEL-pozitivních jader na příčných řezech kořeny 3 dny starých rostlin kukuřice pěstovaných "mezi listy". Řezy byly ošetřeny DAPI a různými procedurami TUNEL, vždy s 20x naředěnou směsí enzymů. AP = TUNEL-AP, TMR = TUNEL-TMR, K+ = pozitivní kontrola. Průměrné hodnoty ± SD, n = 9 až 16*

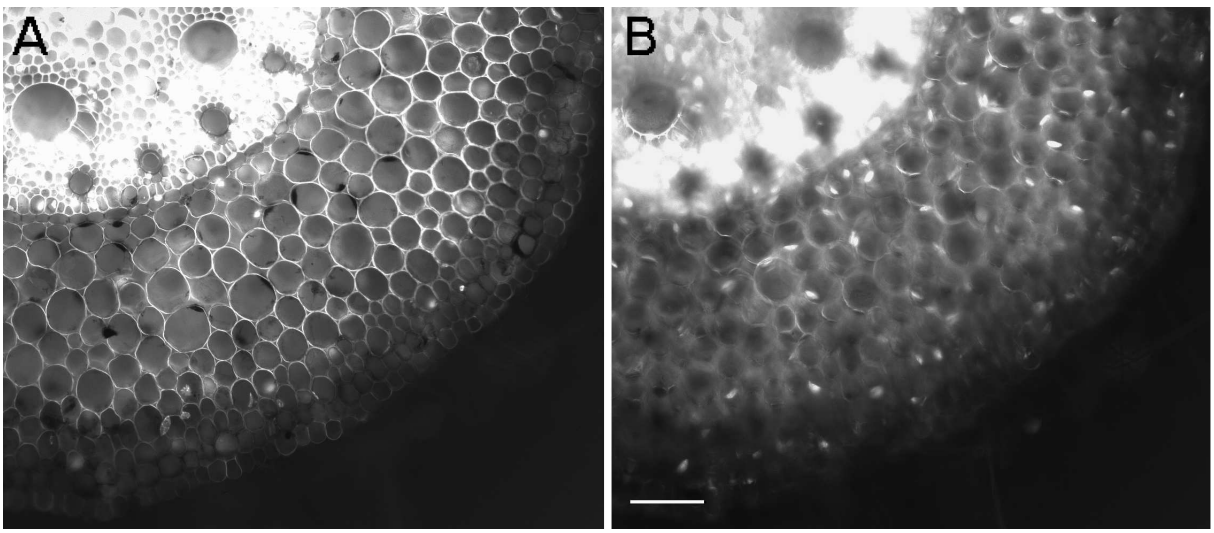
**TUNEL v hlubších vrstvách kořenových řezů:**

U neředěné AP-varianty přineslo zajímavé výsledky sledování počtu TUNEL-pozitivních jader ve dvou rovinách ostření (Obr. 4.13, 4.14, obr. 4.15). Zatímco v rovině řezu byla na příčných řezech v podstatě všechna jádra TUNEL-pozitivní, tedy nelišící se od pozitivní kontroly (dvouvýběrový T-test, P-level = 0,13, $\alpha$ = 0,01; negativní kontrola neobarvena), v hlubších vrstvách naopak byla jádra obarvena pouze prostřednictvím DAPI a TUNEL-pozitivní jádra zde téměř nebyla pozorována (dvouvýběrový T-test, n = 19, 9 a 9; P-levels < 0,007, $\alpha$ = 0,01). Zároveň byl poměr TUNEL-pozitivních jader výrazně vyšší na řezných

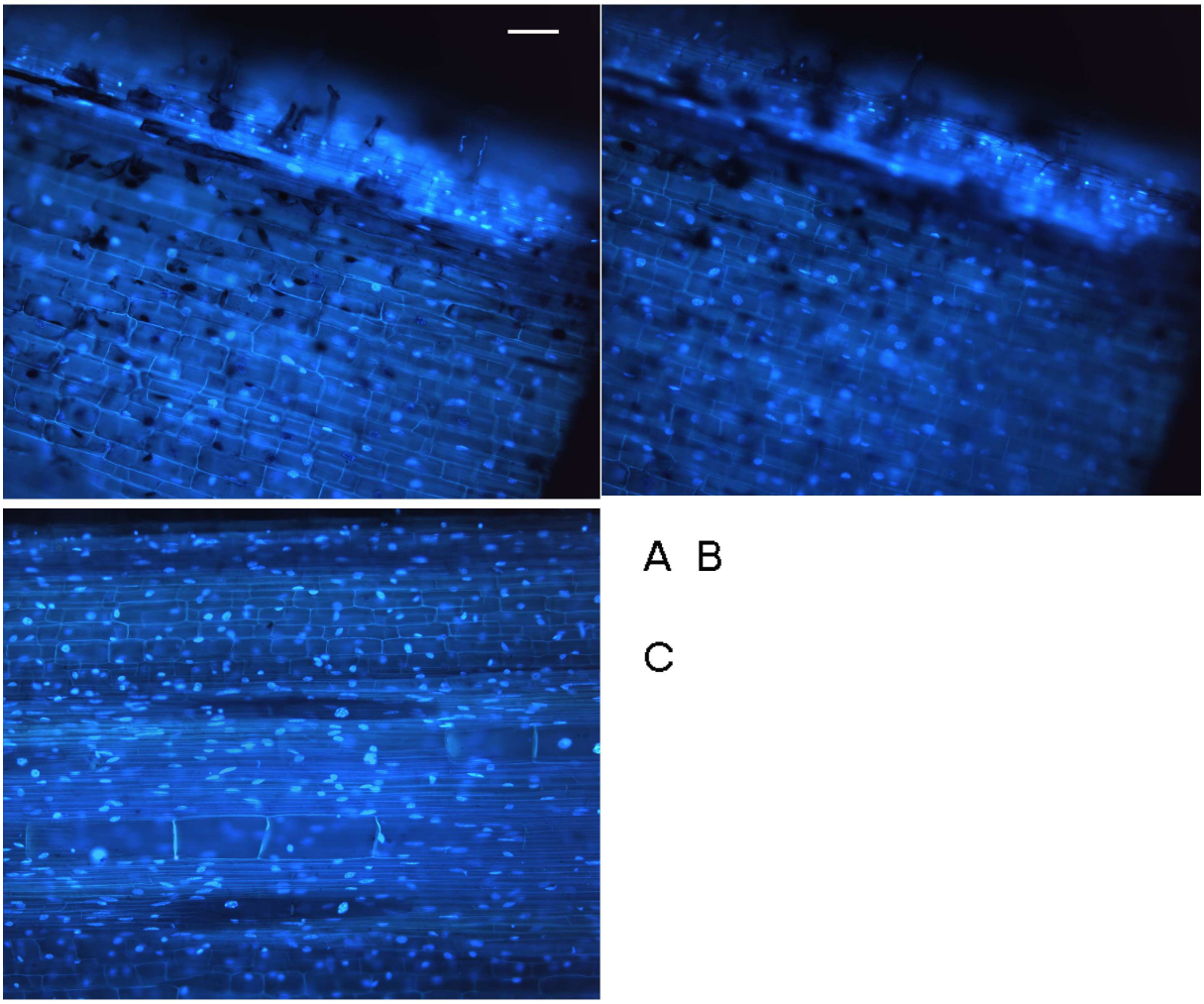
plochách příčných řezů, než tomu bylo u řezů podélných (dvouvýběrový T-test, P-level < 0,001, $\alpha = 0,01$), zatímco hlubší vrstvy se nelišily (P-level = 0,16).




*Obr. 4.13. Srovnání poměrného zastoupení TUNEL-pozitivních jader ve dvou rovinách ostření na příčných a podélných řezech 3 dny starými kořeny kukuřice ošetřené TUNEL-AP a DAPI. K+ je pozitivní kontrola. Průměrné hodnoty ± SD, n = 9 až 19*




*Obr. 4.14. Současné barvení prostřednictvím AP-TUNEL (černé body) a DAPI (bílé body) příčných řezů 3 dny starých kořenů rostlin kukuřice pěstovaných "mezi listy". Sledováno pod UV zářením. A) Obě barvení při zaostření na rovinu řezu, B) zaostřeno na hlubší vrstvy. Úsečka = 100 μm.*




*Obr. 4.15. Současné barvení prostřednictvím AP-TUNEL (černé body) a DAPI (světle modré body) podélných řezů 3 dny starých kořenů rostlin kukuřice pěstovaných "mezi listy". Sledováno pod UV zářením. A) Obě barvení při zaostření na rovinu řezu, B) zaostřeno na hlubší vrstvy, C) negativní kontrola (bez použití roztoku s TdT). Úsečka = 100 μm.*

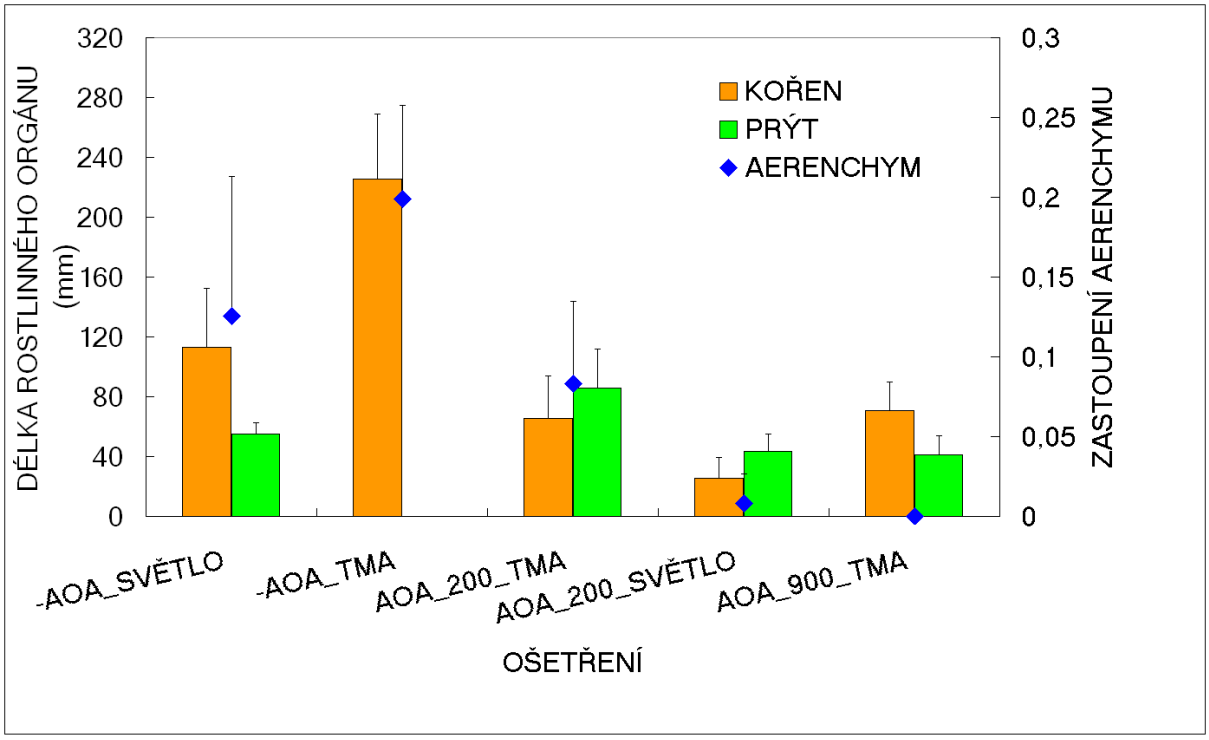
---

Podobně jako u TUNEL-AP tomu bylo i s pronikáním TMR, jak lze soudit podle poměru TUNEL-pozitivních jader na příčných a podélných řezech (Obr. 4.13, dvouvýběrový T-test, n = 23 a 58, P-level < 0,001, $\alpha = 0,01$), i když tato varianta do hlubších vrstev pronikala o něco úspěšněji.

## 4.4 Role etylénu při tvorbě aerenchymu

Význam etylénu pro tvorbu aerenchymu byl sledován pomocí AOA, inhibitoru tvorby etylénu, který byl přidáván do kultivace „mezi listy“. Přítomnost AOA snížila množství vznikajícího aerenchymu, míra účinku však závisela na světelných podmínkách. Obecně lze říci, že v kultivacích, které probíhaly ve tmě, se vliv AOA projevil výrazně méně. Kromě toho se rostliny z temnostních kultivací od rostlin nezatemněných lišily délkou kořenů i prýtů a porozitou kořenů. Při pěstování za fotoperiody 16/8 přídavek 200μM AOA snížil zastoupení aerenchymu na 6,4 % ve srovnání s kontrolou (AOA_200_SVĚTLO ve srovnání s –AOA_SVĚTLO, obr. 4.16). U rostlin, které byly pěstovány za tmy (AOA_200_TMA), byla redukce tvorby aerenchymu méně markantní, šlo o pokles pouze na 41,7 % ve srovnání s rostlinami pěstovanými potmě bez AOA (–AOA_TMA), a rozdíly této temnostní varianty od kontrolní varianty pěstované na světle (-AOA_SVĚTLO) nebyly statisticky průkazné. Tvorba aerenchymu v zakryté variantě byla potlačena až aplikací 900μM AOA.

Rovněž růst kořenů a prýtů byl ovlivněn použitím AOA a různými světelnými podmínkami (Testy Tukey – Kramer a Kruskal – Wallis , P-level < 0.0001, obr. 4.17).
U rostlin pěstovaných při ozáření 500 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ snížilo přidání 200μM AOA oproti kontrole (-AOA_SVĚTLO) délku kořenů na 22,5 %, avšak délku prýtů pouze na 79,3 %. V zakrytých kultivacích, tedy u rostlin, které byly vystaveny neustálé tmě, byly rozměry jednotlivých orgánů přidáním 200μM AOA ovlivněny méně - délka kořenů se snížila na 57,8 % a délka prýtů dokonce stoupla na 119,6 % ve srovnání s kontrolními rostlinami pěstovanými za normálních světelných podmínek (-AOA_SVĚTLO). Až přidáním 900μM AOA došlo k redukci růstu nadzemní i podzemní části sledovaných rostlin. Oproti nezakrytým kontrolním rostlinám byly kořeny zkráceny v průměru na 62,5 % a prýty na 74,5 % (Lenochova et al. 2009).

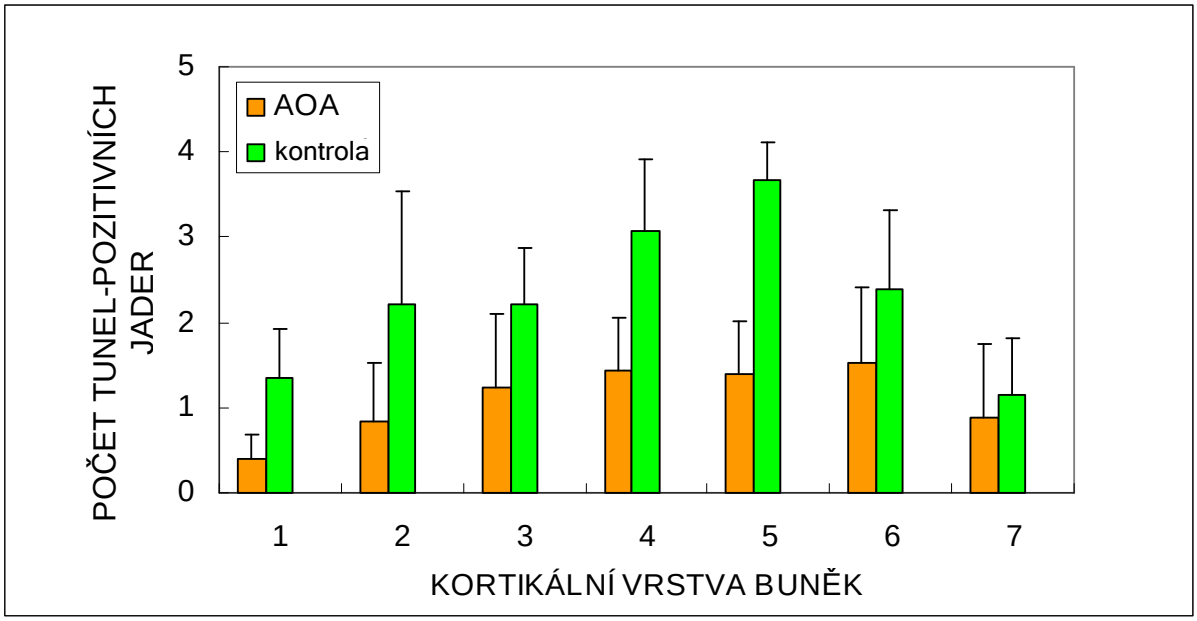



*Obr. 4.16. Efekt ošetření různými koncentracemi (0, 200 a 900µM), a světelnými podmínkami na zastoupení aerenchymu ve ¾ délky kořenů a na délku kořenů a prýtů při kultivaci „mezi listy“. Znázorněny jsou průměrné hodnoty, chybové úsečky představují SD, n = 9 – 11 kořenů (Lenochova et al. 2009).*

---

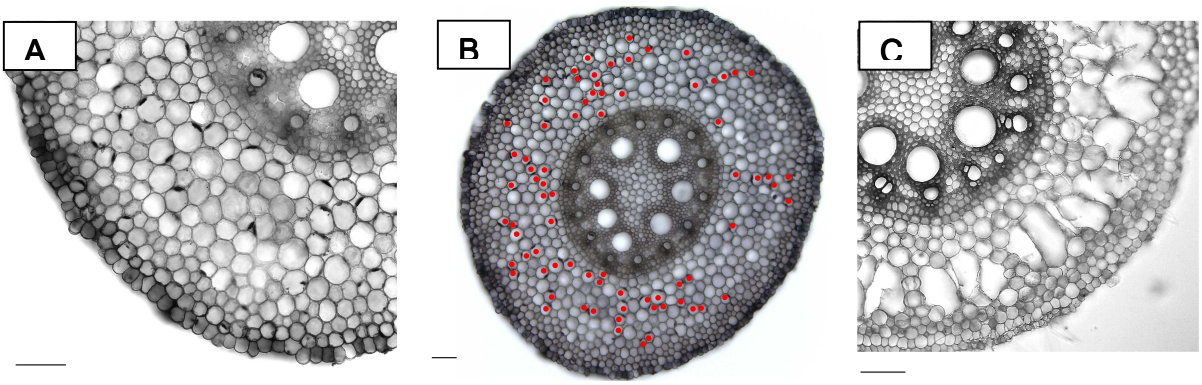
### 4.5 TUNEL reakce a její lokalizace v kořenech kukuřice:

Pro detekci vnitrojaderných procesů typických pro PCD byla použita TUNEL reakce (varianta TUNEL-AP). TUNEL-pozitivní jádra byla nalezena v kortikálních buňkách rostlin pěstovaných za běžné fotoperiody “mezi listy” a běžných kultivačních podmínek i při ošetření 200µM AOA, přičemž byl jejich počet ovlivněn aplikací AOA (snížen oproti kontrole, $P < 0{,}0001$) a pozicí buňky v primární kůře (vzdálenost od středního válce, $P < 0.05$), avšak ne interakcí těchto faktorů. Kontrolní a ošetřené rostliny se signifikantně lišily počtem TUNEL-pozitivních jader ve 3., 4., 5. a 6. vrstvě kortikálních buněk (počítáno od endodermis, obr. 4.17). Buňky s TUNEL-pozitivními jádry byly uspořádány do paprsčitých shluků (obr. 4.18), (Lenochova et al. 2009).




*Obr. 4.17. Počet TUNEL-pozitivních jader v jednotlivých kortikálních vrstvách (1. je vrstva nejblíže k endodermis) na příčném průřezu kořeny rostlin pěstovaných za běžné fotoperiody "mezi listy" v Hoaglandově roztoku (kontrola) a v Hoaglandově roztoku s 200 μM AOA (AOA).*
*Průměrné hodnoty ± SD, n = 5. (Lenochova et al. 2009).*

---




*Obr. 4.18 - TUNEL reakce a tvorba aerenchymu v kořenech kukuřice, pěstovaných 7 dní "mezi listy". Fotografie z 2 dny starých částí kořenů. Buňky s TUNEL-pozitivními jádry (A) byly označeny červenými tečkami a spočítány v každé kortikální vrstvě (B). Jejich rozmístění v radiálních shlucích koresponduje s rozložením aerenchymatických kanálů v řezech ze starších částí kořenů (C). Úsečka = 100 μm. (Lenochova et al. 2009).*

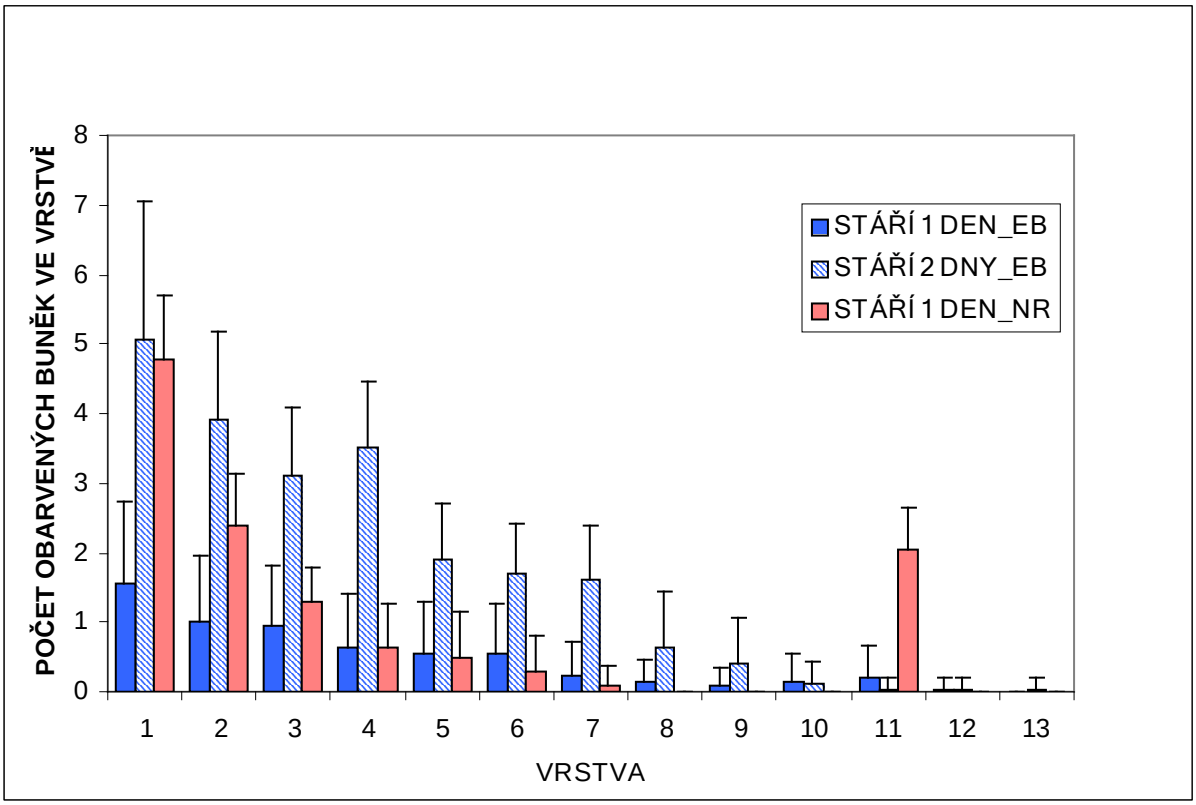
---

### 4.6 Viabilita kortikálních buněk:

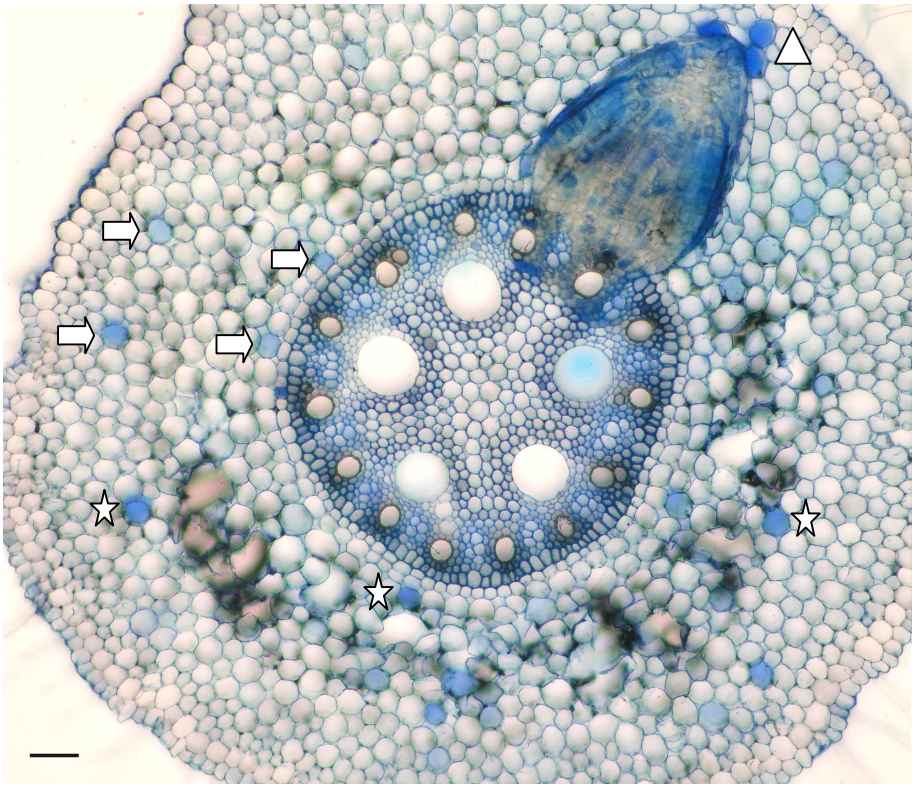
Na příčných i podélných řezech kořeny kukuřice bylo sledováno, které ze zde přítomných buněk podléhají fyziologickým změnám spojeným s degradací. Neutrální červení (NR) a Evansovou modří (EB) se však nebarvily přednostně buňky střední části primární kůry, ve které dochází k odumírání buněk a tvorbě aerenchymatických kanálů nejdříve. Rozmístění obarvených buněk bylo poměrně chaotické, přesto bylo možno pozorovat jistý řád v uspořádání buněk zbarvených Evansovou modří, a to především ve starších částech kořenů. Tyto buňky se zde vyskytovaly v blízkosti aerenchymatických kanálů nebo prorážejících kořenových primordií, převažovala lokalizace ve vrstvách bližších střednímu válci (obr. 4.20, 4.21, 4.22). V některých případech byla Evansovou modří obarvena velká část buněk (obr. 4.23).

Barvení neutrální červení se ukázalo jako nespolehlivé. Bylo obtížné odlišit od sebe zbarvení způsobené NR od zbarvení přirozeného, daného přítomností antokyanů ve vakuolách některých buněk, především takových, na které dopadalo denní světlo, tedy často buněk podpokožkových. Kromě toho intenzita zbarvení dosaženého pomocí NR mezi jednotlivými buňkami kolísala a jejich uspořádání bylo značně nepravidelné (obr. 4.24).

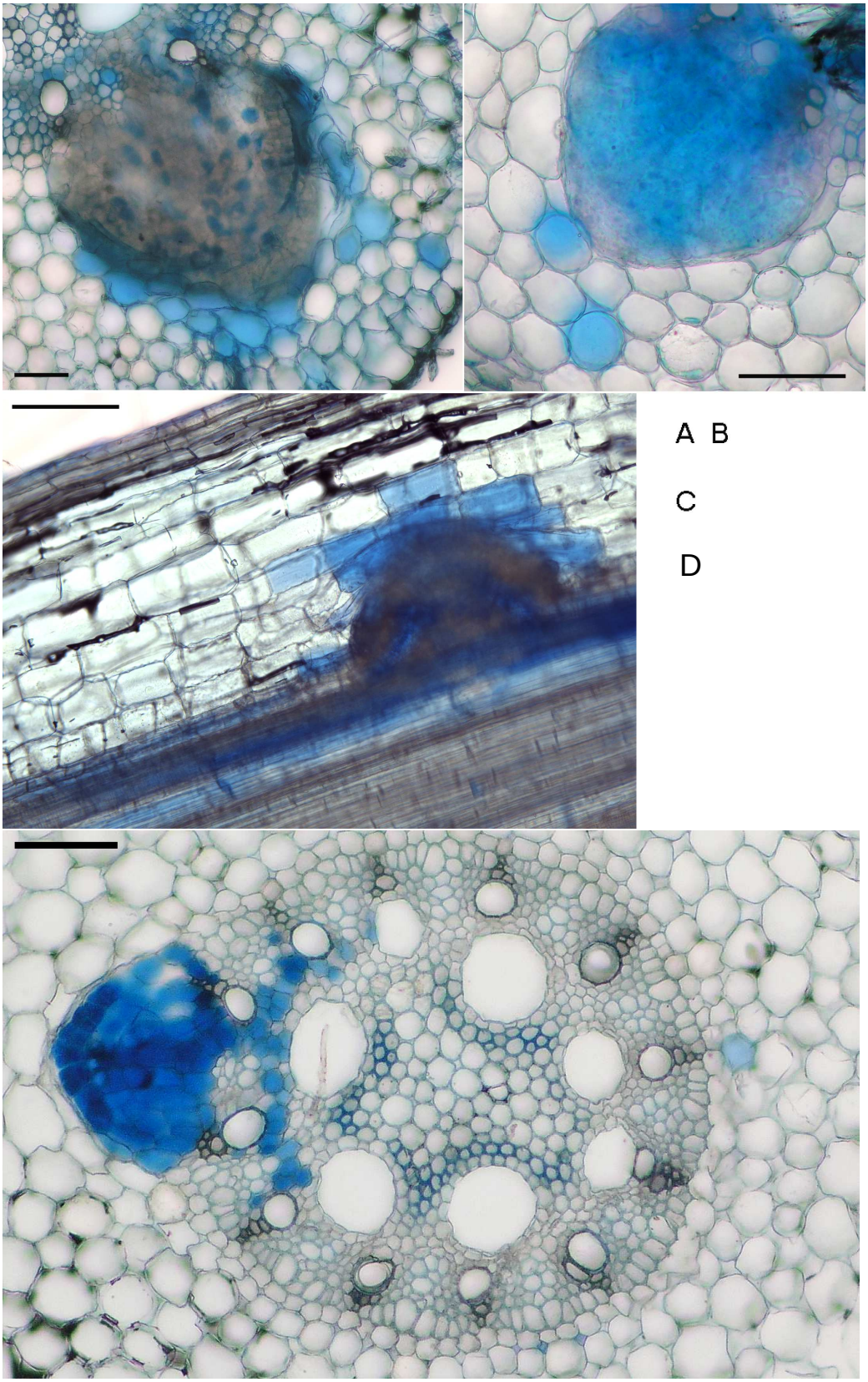
Mezi barvením neutrální červení a Evansovou modří byla statisticky průkazná korelace pouze na jeden den starých úsecích kořenů (Spearmanův koeficient $r$ = 0,869656, $\alpha$= 0,05) a slaběji mezi jeden den starými úseky barvenými NR a dva dny starými úseky barvenými EB (Spearmanův koeficient $r$= 0,564864, $\alpha$= 0,05), obr. 4.19.



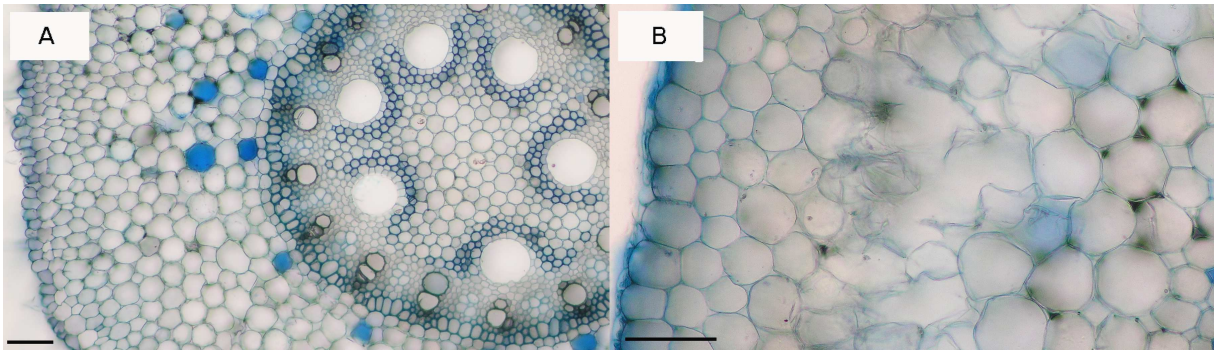

*Obr. 4.19. Počet buněk obarvených prostřednictvím Evansovy modři (EB) nebo neutrální červeně (NR) v jednotlivých vrstvách kortikálních buněk počítaných od středního válce na příčném řezu kořenů rostlin pěstovaných sedm dní „mezi listy“. Průměrné hodnoty ± SD, n =34 až 39 řezů, 5 kořenů.*



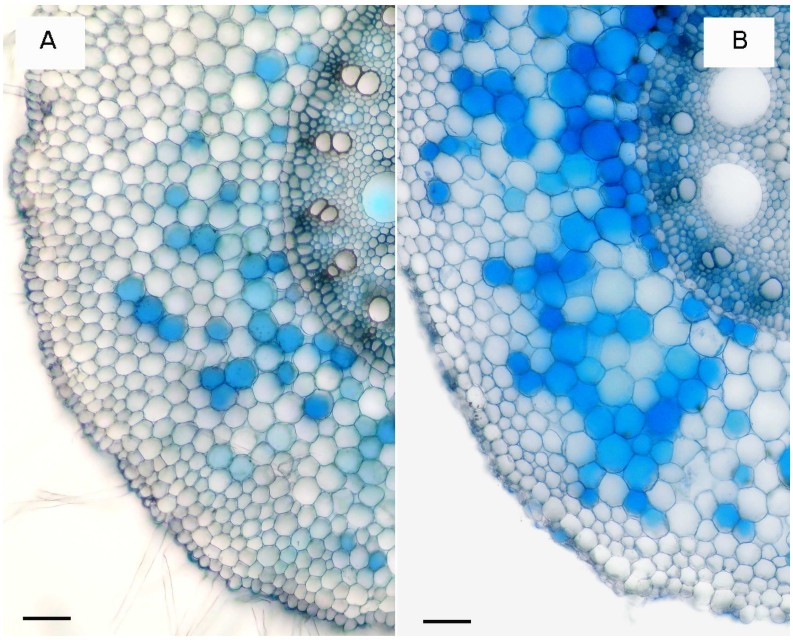
*Obr. 4.20. Barvení pomocí Evansovy modři, primární kůra příčných řezů báze kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. Obarvené buňky jsou lokalizovány buď v blízkosti prorážejících primordí (Δ), poblíž vznikajících aerenchymatických kanálů(*) nebo poměrně pravidelně uspořádány ve vnitřních a středních vrstvách primární kůry (⇨). Úsečka = 100 μm.*



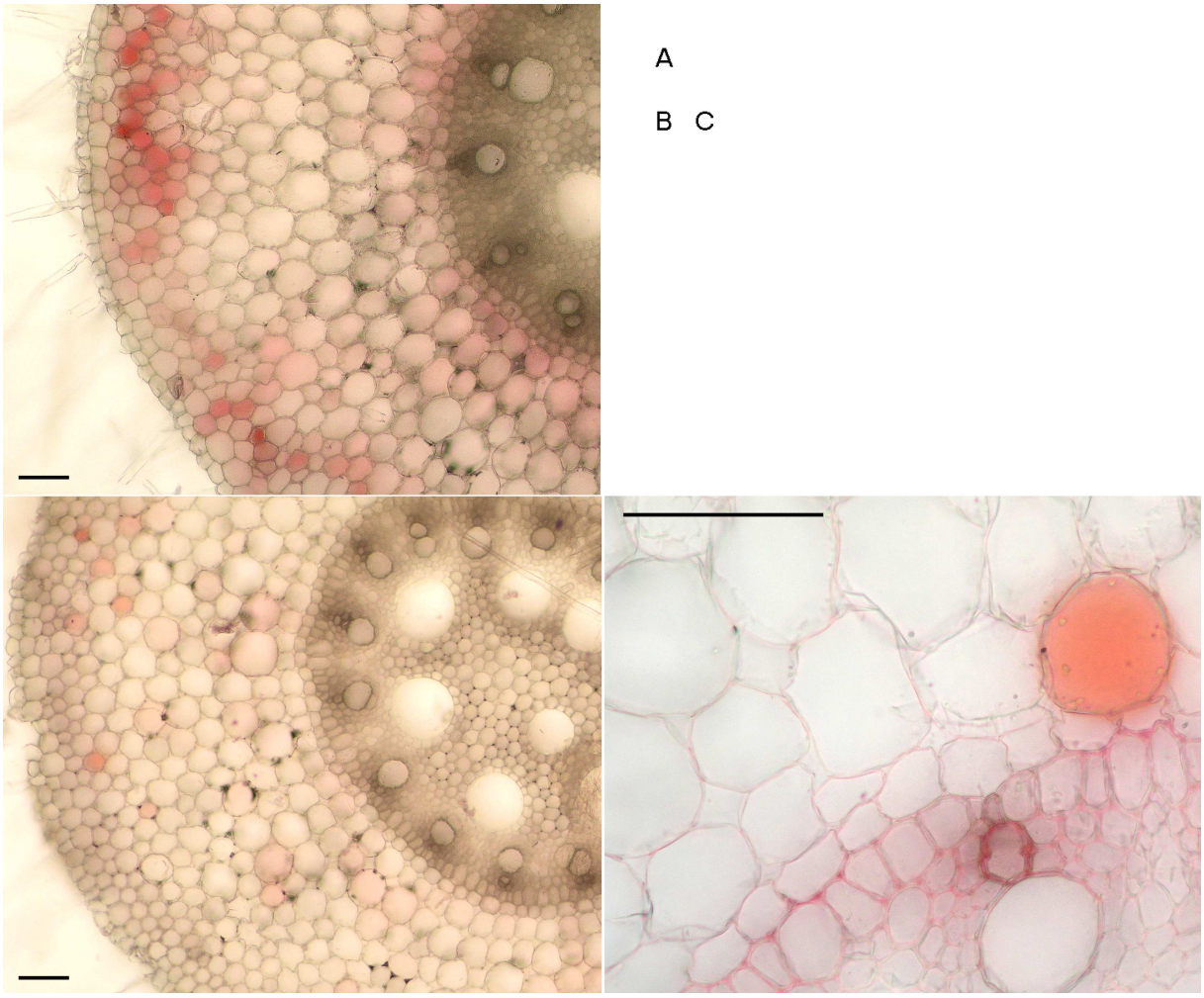

*Obr. 4.21. Barvení pomocí Evansovy modři, primární kůra příčných(A,B, D) a podélných (C) řezů ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. Obarvené buňky jsou lokalizovány v oblasti či v blízkosti prorážejících primordií. Úsečka = 100 μm.*




*Obr. 4.22. Barvení pomocí Evansovy modři, primární kůra příčných řezů ze ¾ délky kořene (A) a z báze kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“ (B). Obarvené buňky jsou poměrně pravidelně uspořádány ve vnitřních (A) a středních vrstvách primární kůry (B).Úsečka = 100 μm.*



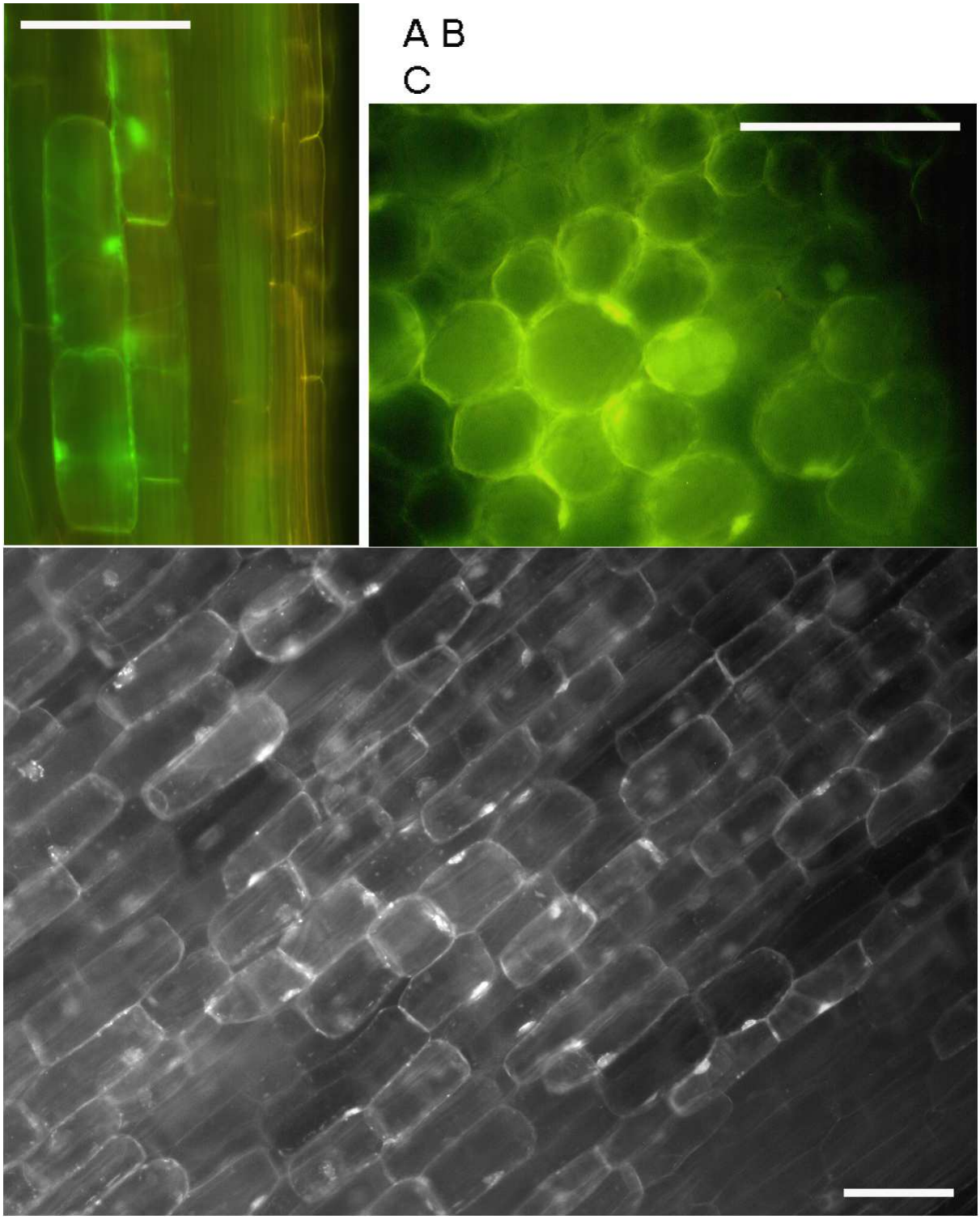

*Obr. 4.23. Barvení pomocí Evansovy modři, primární kůra příčných řezů ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 3 dny „mezi listy“. Zatímco na snímku A) lze uvažovat o zbarvení způsobeném skutečně fyziologickým porušením plazmatických membrán, v případě B) se jedná pravděpodobně o artefakt daný poškozením buněk během řezání a následným nedostatečným vymytím barviva. Úsečka = 100 μm.*



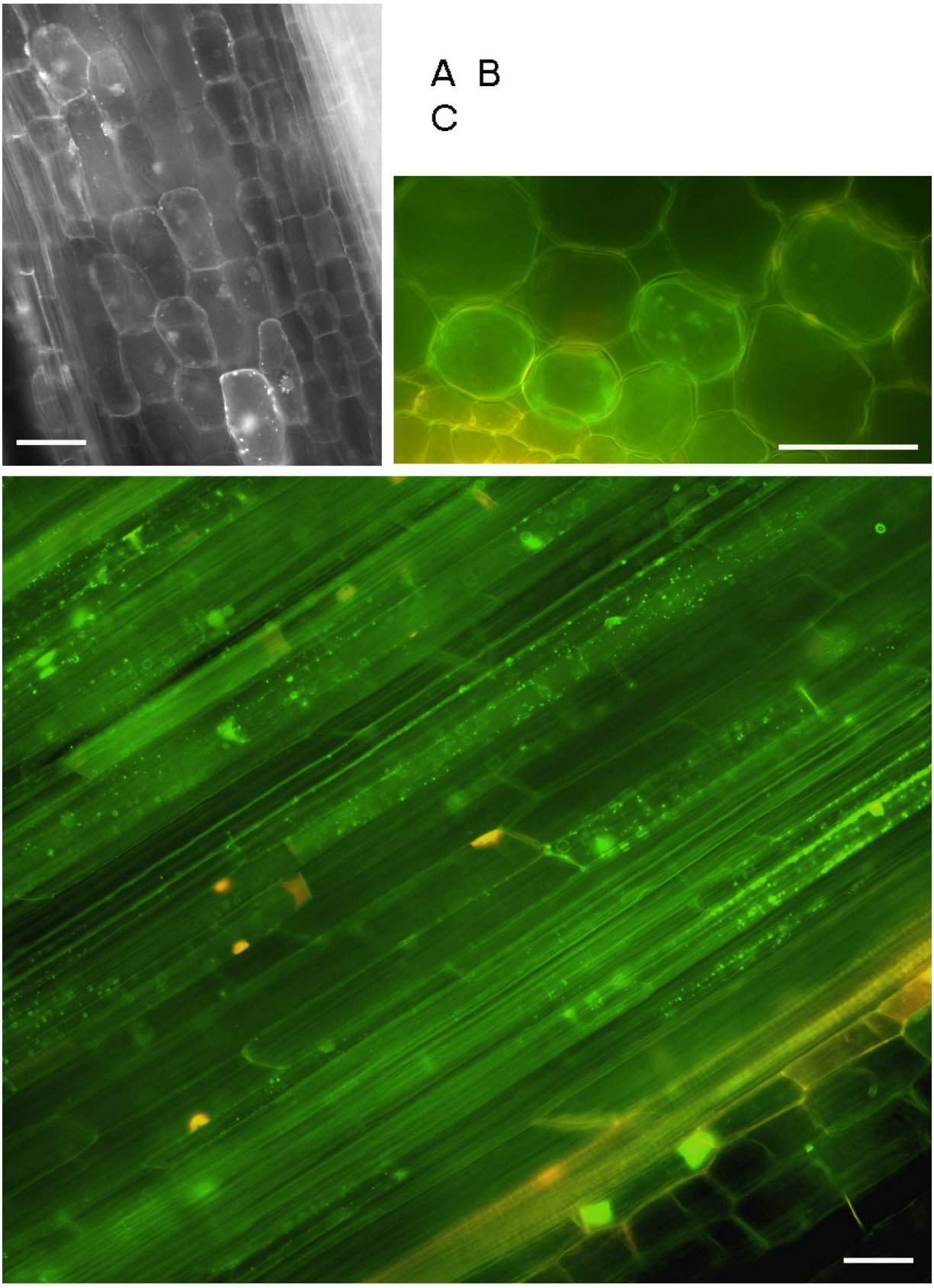

*Obr. 4.24. Primární kůra příčných řezů ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 3 dny v perlitu (A) nebo„mezi listy“ (B, C). A - přirozené zbarvení kortikálních buněk způsobené antokyany uloženými ve vakuolách kortikálních buněk. B, C - zbarvení kortikálních buněk neutrální červení. Úsečka = 100 μm.*

Podobně jako Evansova modř bývá využíván i oranžovo-červeně fluorescenční propidium iodid (PI) vážící se na DNA v buňkách s poškozenou membránou. V kombinaci s ním byl aplikován fluorescein diacetát (FDA), který se stává zeleně fluorescenčním v živých buňkách. Výsledky použití výše uvedených látek neodpovídaly zcela literárním údajům a pro jejich odpovídající interpretaci bylo nutno provést řadu experimentů s využitím jednak různých kombinací zmíněného barvení, jednak různého rostlinného materiálu. Ukázalo se, že vzhledem k výrazné vakuolizaci sledovaných buněk a relativně velmi tenké vrstvě cytoplazmy se činnost cytoplazmatických esteráz v intaktních buňkách projevila po použití

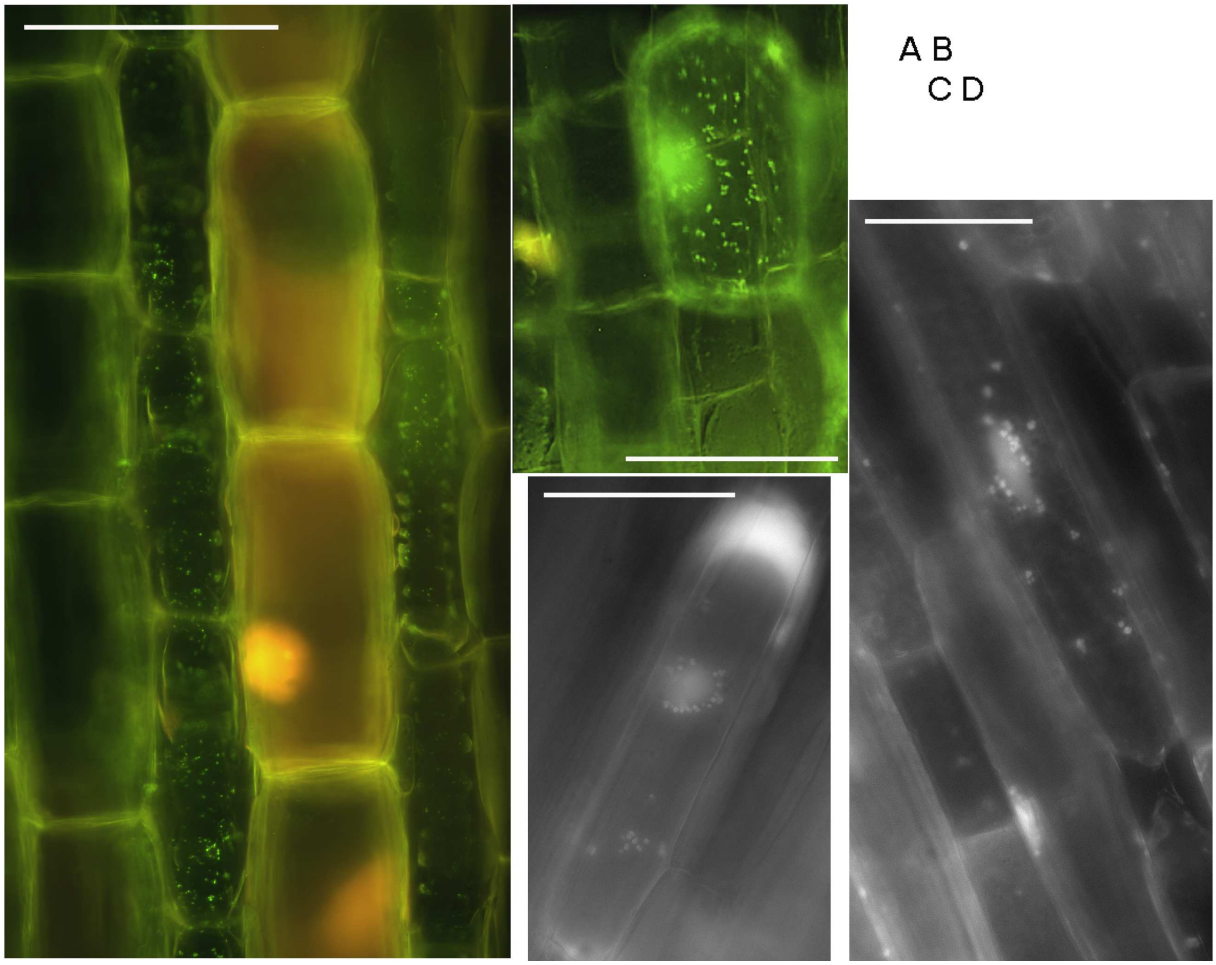
FDA pouze nevýrazným zbarvením (obr. 4.25). V některých buňkách, často buňkách diferencujících se vodivých pletiv v oblasti středního válce či v buňkách střední části primární kůry, se objevovaly zeleně zbarvené měchýřkovité útvary, mnohdy nahromaděné kolem buněčných jader. Takovéto buňky se nezřídka vyskytovaly v sousedství buněk s jádry obarvenými PI (obr. 4.26, 4.27).




*Obr. 4.25. Barené a monochromatické (C) snímky podélných (A,C) a příčných řezů (B) z ½ délky kořene kukuřice obarveného FDA. Fluorescenčně zbarvená je pouze tenká vrstva nástěnné cytoplazmy a cytoplazma okolo jádra. Úsečka = 100 μm.*



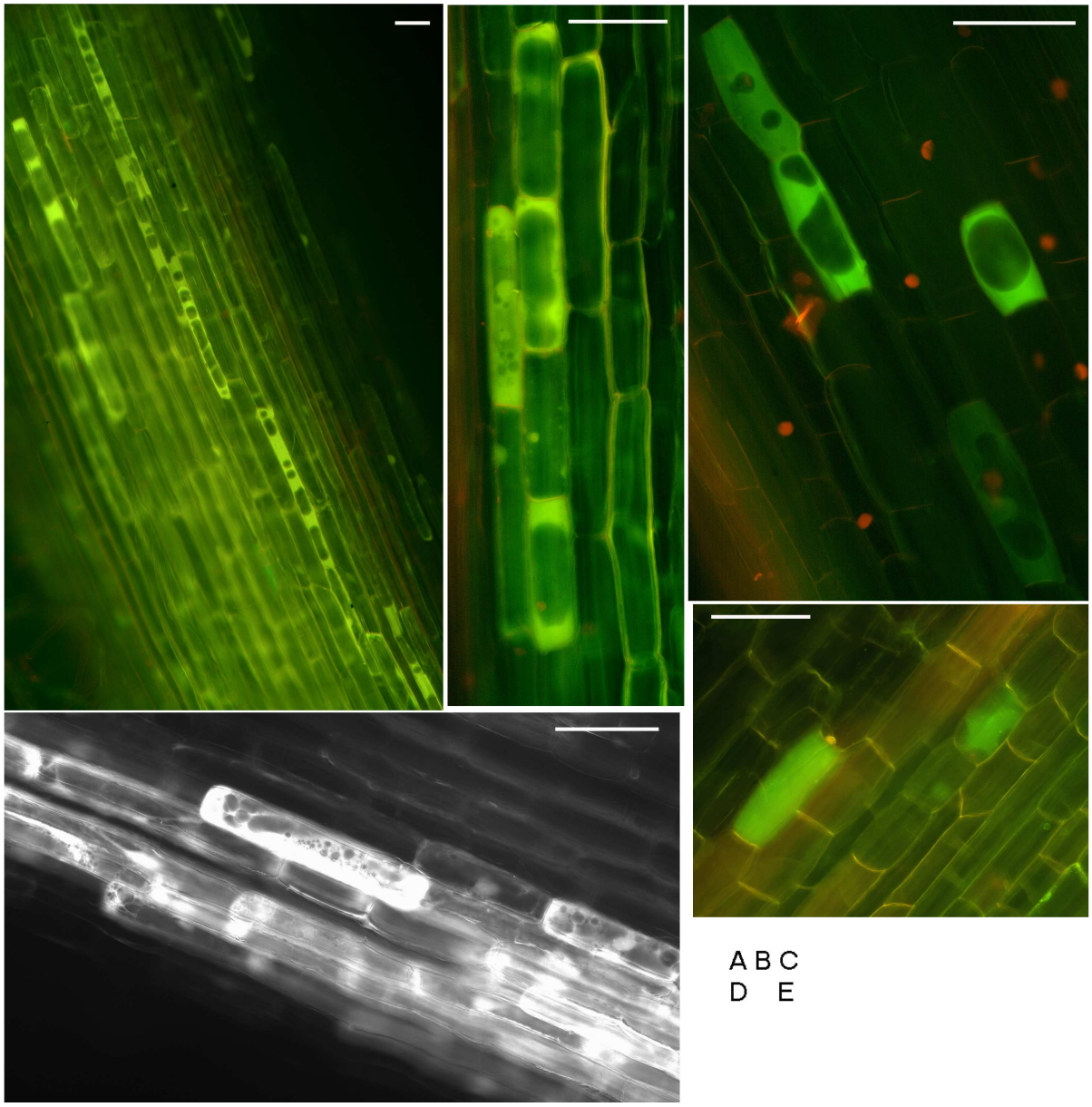

*Obr. 4.26. Barevné (B,C) a monochromatické(A) snímky podélného (A,C) a příčného řezu (B) ze ¾ délky kořene kukuřice obarveného FDA (zeleně) a PI (oranžově; B,C). Buňky s fluorescenčně zbarvenými váčky jsou lokalizovány v oblasti primární kůry (A,B) nebo středního válce, často v blízkosti buněk s jádry obarvenými PI. Úsečka = 100 μm.*



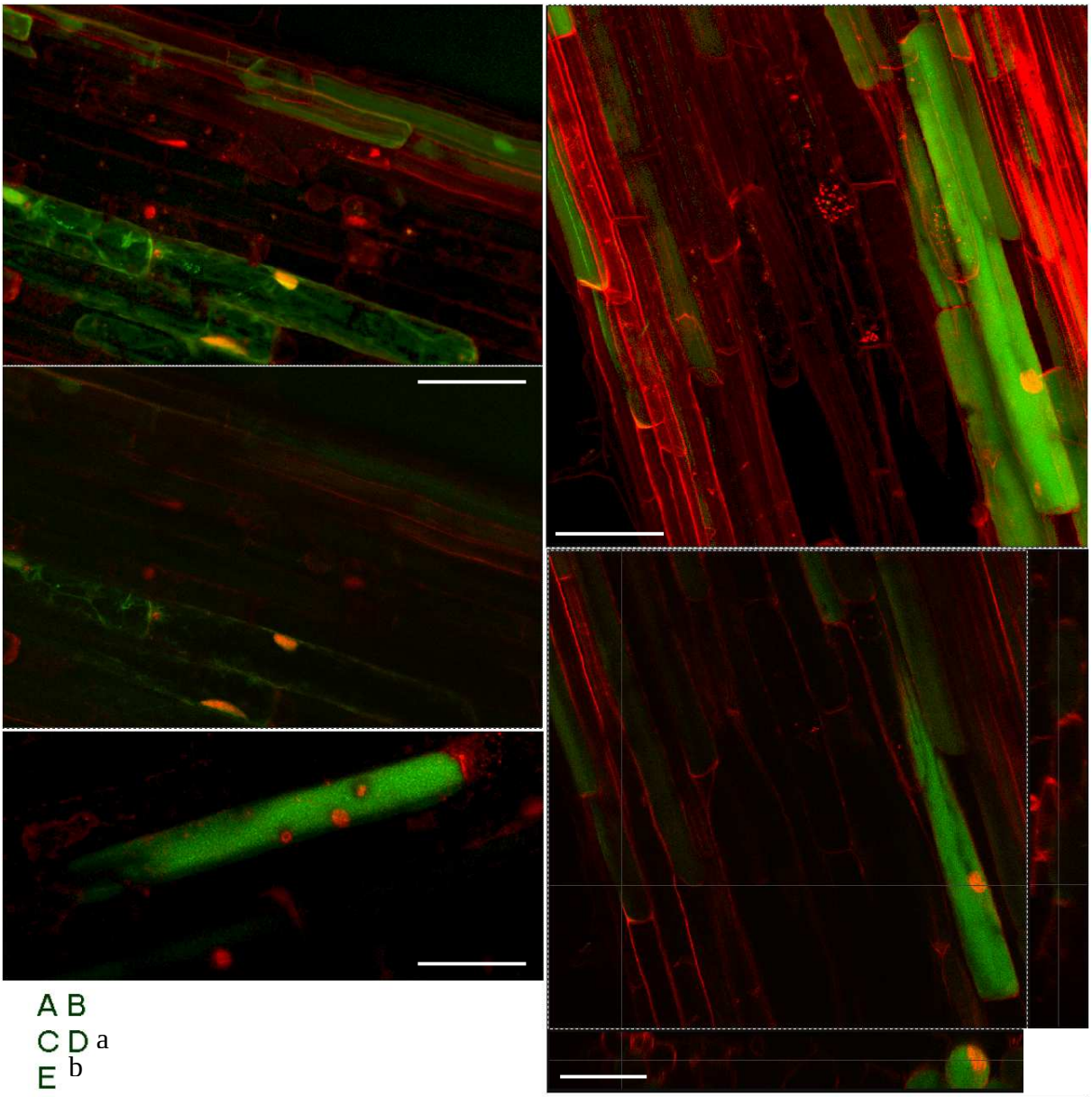

*Obr. 4.27. Barevné (A,B) a monochromatické(C,D) snímky podélných řezů ze ¾ délky kořene kukuřice obarveného FDA (zeleně) a PI (oranžově; A, B). Buňky s fluorescenčně zbarvenými váčky v oblasti primární kůry, často v blízkosti buněk s jádry obarvenými PI; váčky obklopující jádro (B,C,D). Úsečka = 100 μm.*

Podobnou lokalizaci vykazovaly pak i buňky fluoresceinem výrazně zbarvené, někdy stejnoměrně v celém objemu buňky, jindy toto zbarvení vyplňovalo okolí poměrně velkých váčkovitých struktur (obr. 4.28). S použitím konfokálního mikroskopu bylo zjištěno, že tyto buňky mohou zároveň obsahovat jádro obarvené PI (obr. 4.29).

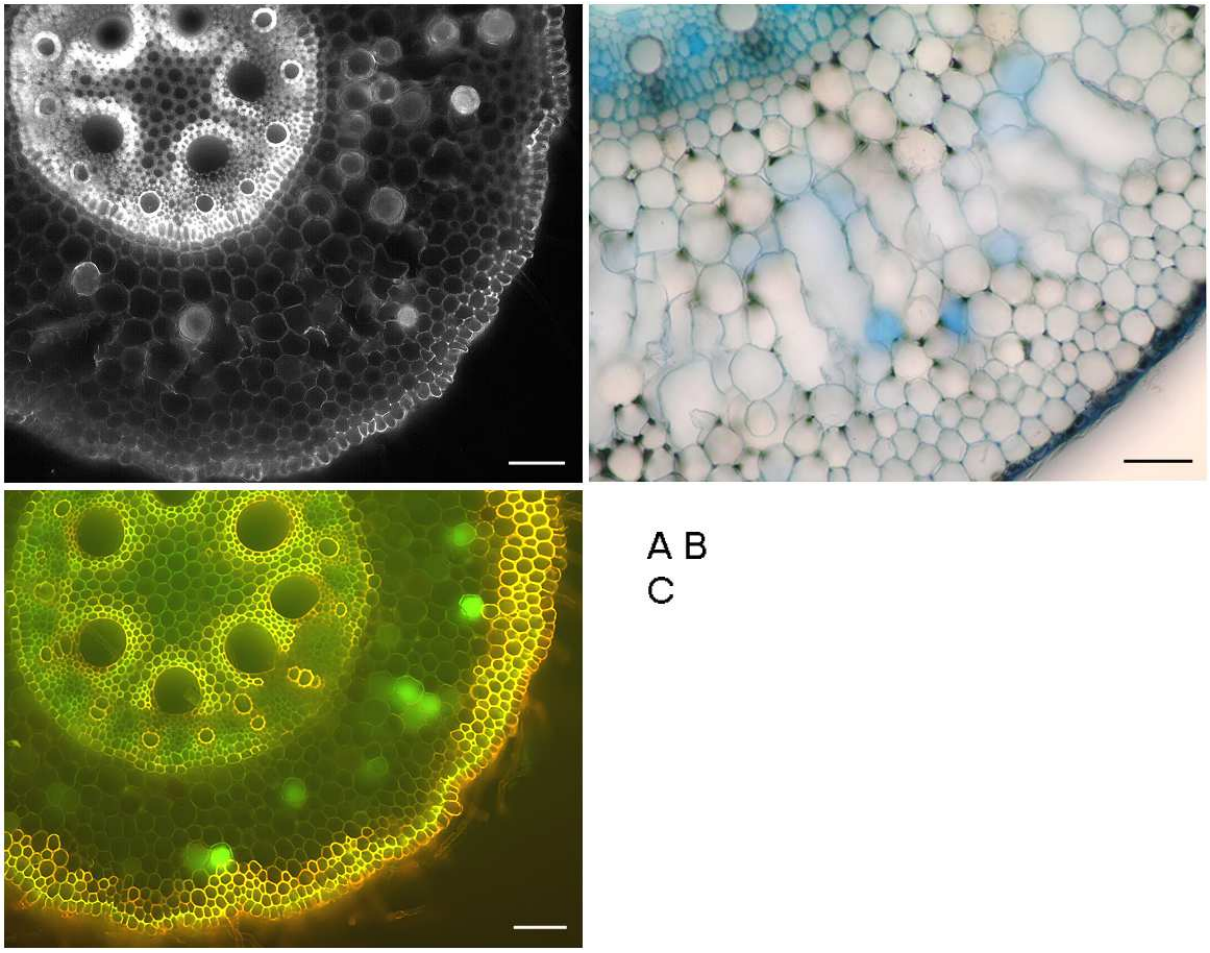
Na příčných řezech bylo možno sledovat podobnost v umístění takto výrazně zbarvených buněk s buňkami obarvenými EB (obr. 4.30).




*Obr. 4.28. Barevné a monochromatické (D) snímky podélných řezů ze ¾ délky kořene kukuřice obarveného FDA (zeleně) a PI (oranžově;B, C,E). Buňky s fluorescenčně zbarveným obsahem v oblasti středního válce (A) a primární kůry, často v blízkosti buněk s jádry obarvenými PI (C,E), fluorescenčně zbarvený obsah obklopuje membránou ohraničené útvary nebo je v nich uzavřen (B). Úsečka = 100 μm.*




*Obr.4.29. Pomocí konfokálního mikroskopu pořízené snímky podélných řezů ze ¾ délky kořene kukuřice pěstované 4 dny „mezi listy“. V některých buňkách primární kůry je pozorovatelné jak zelené zbarvení cytoplazmy způsobené FDA, tak i červené zbarvení jader (PI). Plazmatické membrány jsou zvýrazněné pomocí FM4-64. A, B, E – pohledy vzniklé složením snímků ze 77 postupně snímaných rovin s rozestupem 0,65μm. C, D – snímky pouze jedné roviny, v D) složení s pohledy v kolmých rovinách (a, b). Zachyceny jsou buňky v různých fázích degradace: A, C - porušená integrita plazmalemy (jádro obarvené PI, celistvé), cytoplazma odlišitelná od vykuoly; B, D – porušená integrita plazmalemy i tonoplastu, obsah vakuoly je promísen s cytoplazmou; E – porušená plazmalema i tonoplast, jádro rozpadlé na několik menších útvarů. Excitace vlnovými délkami 458 a 543 nm, emitované vlnové délky 470 – 530, 550 – 667nm. Úsečka = 100 μm.*

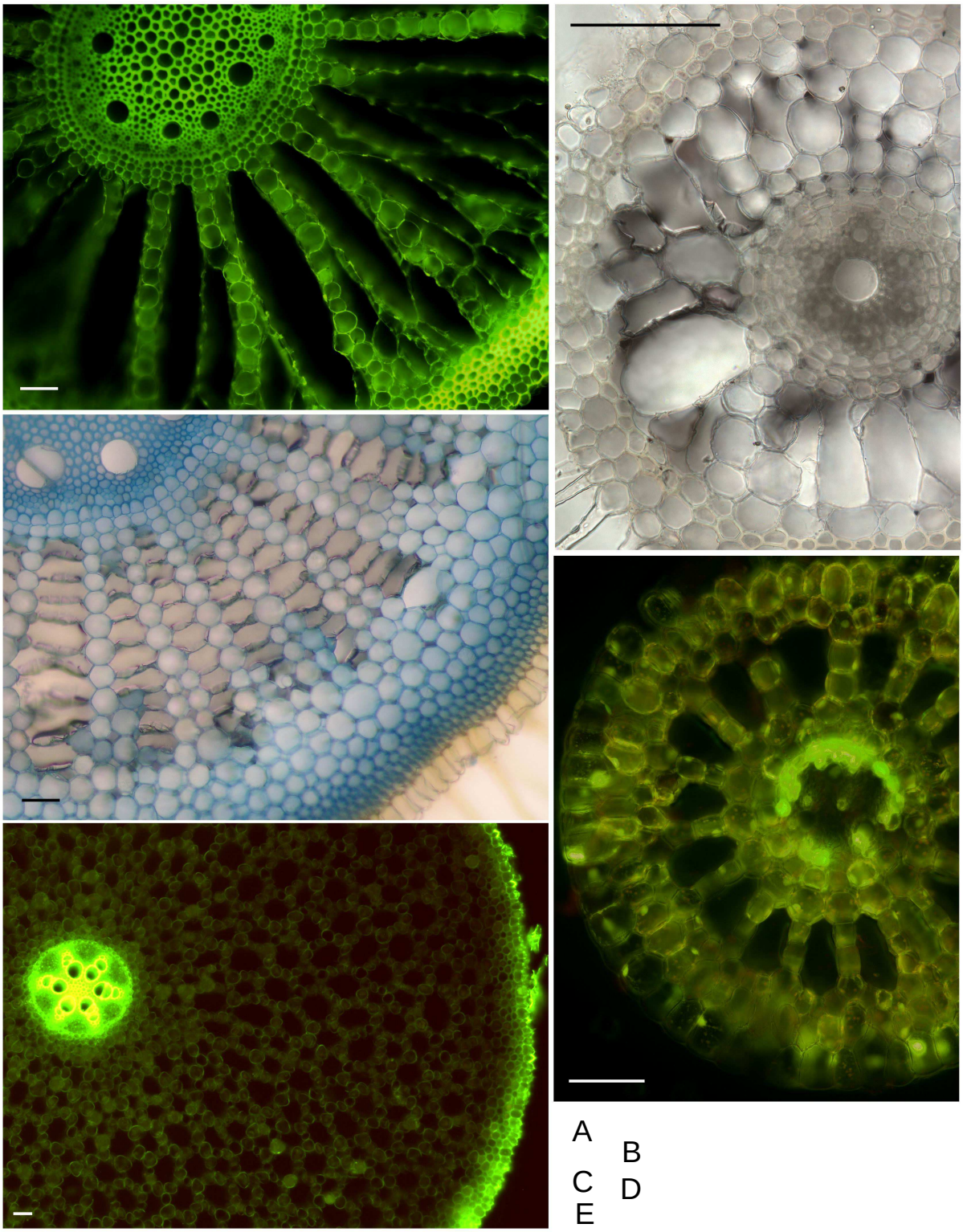



*Obr. 4.30. Barevné (C) a monochromatické (A) snímky příčných řezů z ½ (C) a ze ¾ délky kořene kukuřice obarveného FDA (zeleně, A,C) a PI (oranžově; C). B) – řez obarvený Evansovou modří. Obarvené buňky v blízkosti vznikajících aerenchymatických kanálů. Úsečka = 100 μm.*

## 4.7 Pozorování kortikálních buněk a jejich změn v kořenech typických mokřadních rostlin

Výše uvedené metody použité u kořenů kukuřice pro sledování viability a fyziologických změn jejich kortikálních buněk byly aplikovány i na kořeny typických mokřadních rostlin. Navíc byla jako látka zvýrazňující všechna jádra použita zelená SYTO16 a jako látka detekující nízké pH a poškozenou DNA akridinová oranž (AO).

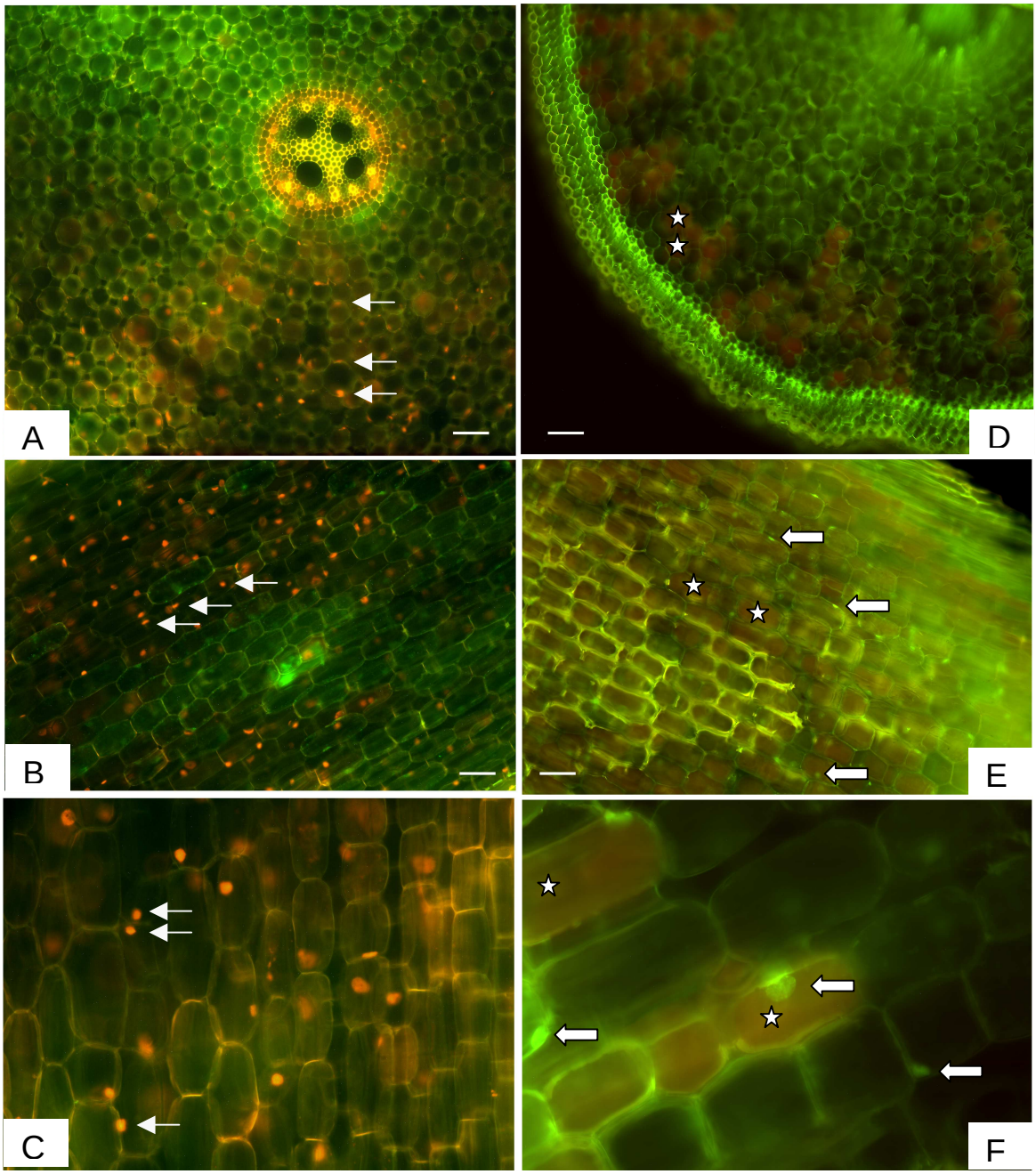
U mokřadních rostlin vzniká aerenchymatické pletivo konstitutivně, bez nutnosti vnějšího stimulu. Mezi rostliny, u nichž se jedná o aerenchym lyzigenní, tedy takový, jehož tvorba je provázena buněčnou smrtí, patří např. rákos obecný, ostřice úzkolistá, rýže setá a voďanka žabí. Puškvorec obecný byl vybrán jako příklad rostliny s aerenchymem schizogenního typu, tedy takovým, který vzniká řízeným rozestoupením živých buněk a zvětšením intercelulár mezi nimi, tedy jako rostlina, v jejíchž kořenech by při vzniku aerenchymu nemělo docházet k (programované) buněčné smrti. Přehled uspořádání primární kůry uvedených rostlin viz obr. 4.31.



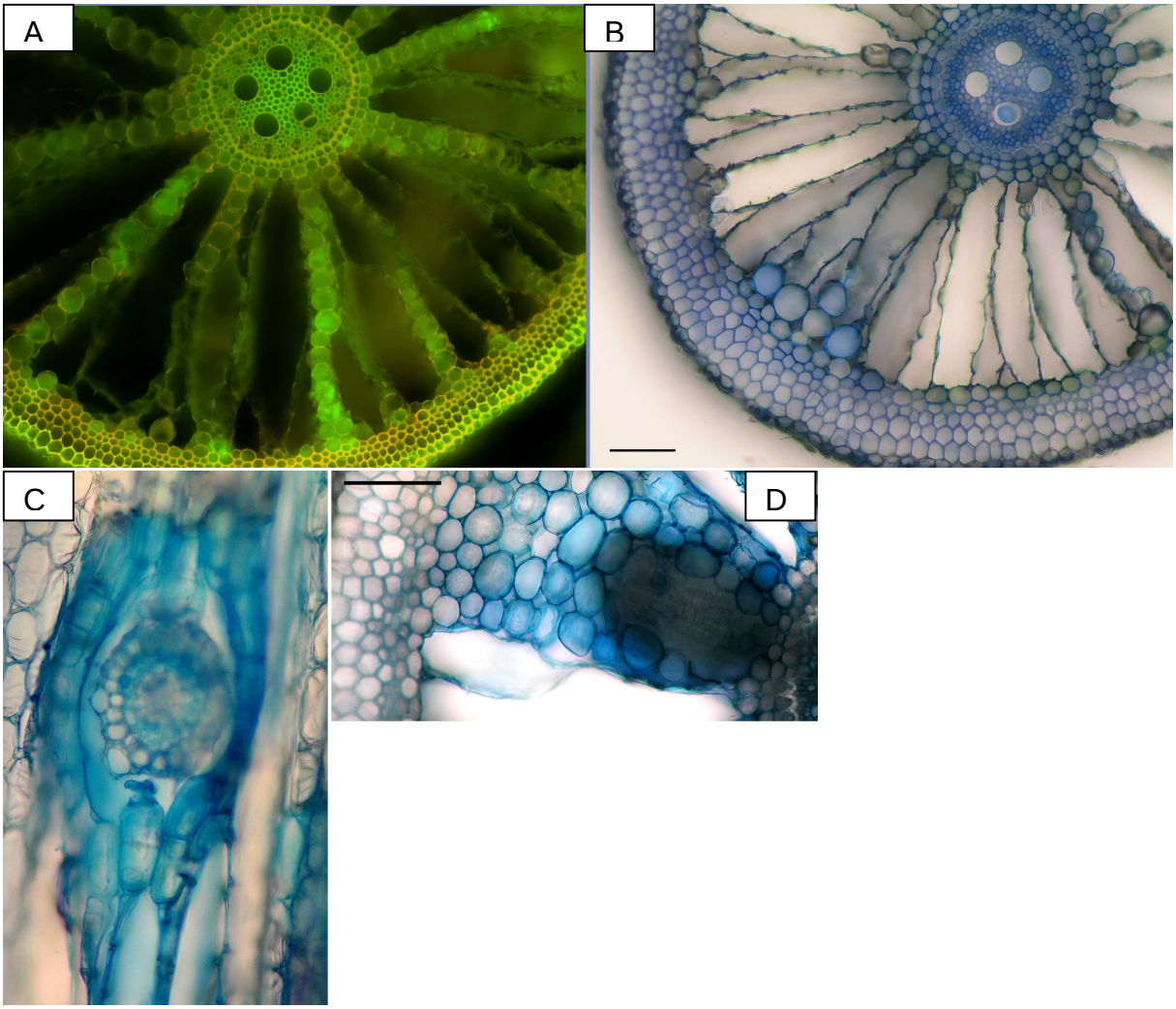

*Obr. 4.31. Přehled uspořádání kortikálních buněk u vybraných druhů mokřadních rosltin. A-D – lyzigenní aerenchym, E – aerenchym schizogenní. A – Phragmites australis, B – Oryza sativa, C – Carex gracilis, D – Hydrocharis morsus-ranae, E – Acorus calamus. A, D, E – snímky z fluorescenčního mikroskopu, řezy barvené FDA; B – nebarvený řez pozorovaný ve světlém poli; C – řez barvený Evansovou modří, pozorovaný ve světlém poli.*
*Úsečka = 100 μm*

*Rákos obecný,* Phragmites australis*:*

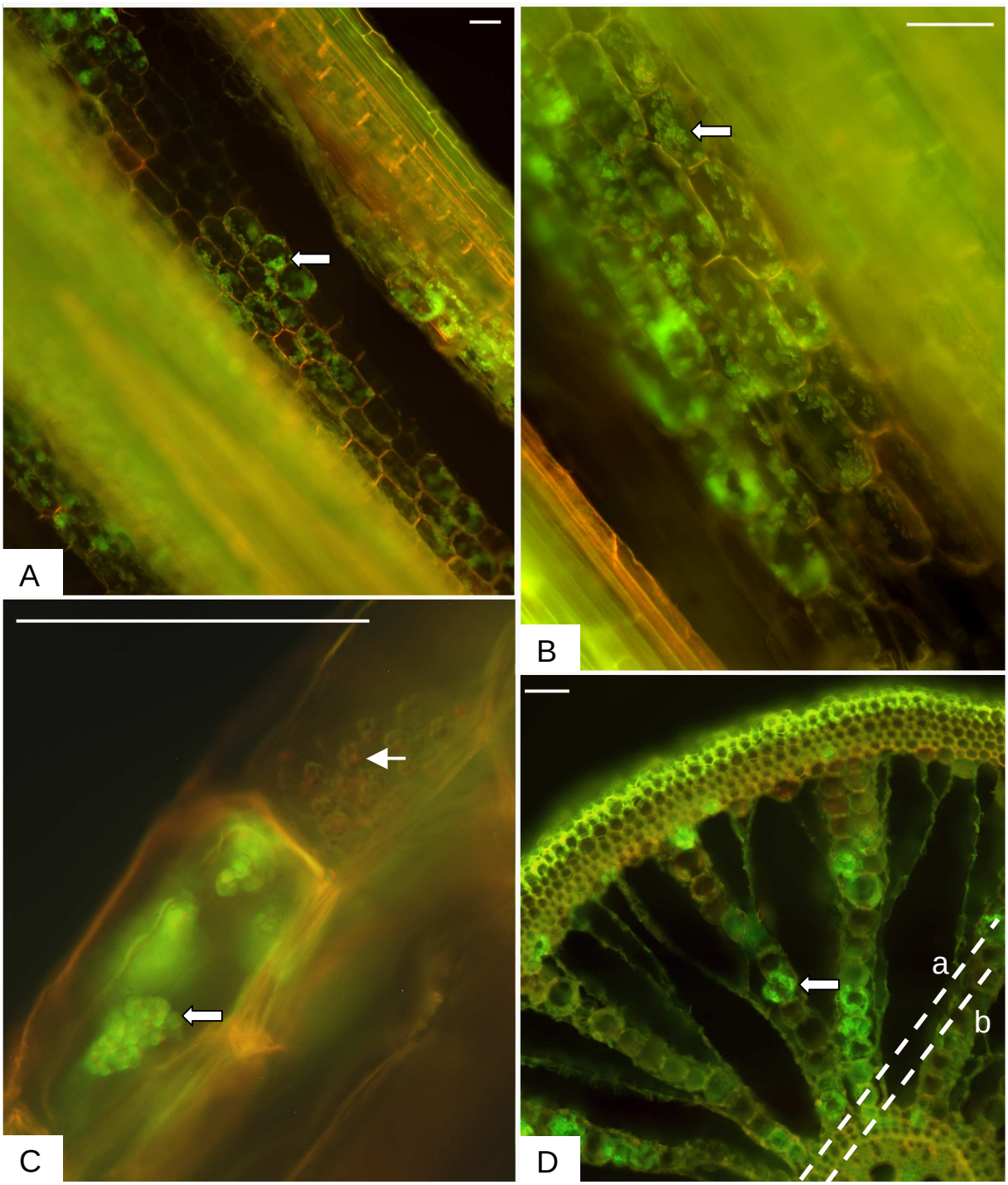
Rákos je příkladem rostliny, u níž dochází ke zvětšování kořenových mezibuněčných prostor v důsledku odumírání kortikálních buněk. Jejich pozůstatkem jsou radiálně uspořádané provazce tvořené zbytky buněčných stěn. Pro srovnání a sledování vývoje byly vybrány úseky kořenů vzdálené 3 a 6 cm od kořenové špičky a úseky z oblasti kořenové báze, tedy přechodu mezi kořenem a oddenkem. Ve starších částech kořenů bylo možné najít jak buňky zcela degradované, tak živé buňky vykazující anatomicko-fyziologické změny. V mladších úsecích se objevovaly buňky fluoresceinem zbarvené nevýrazně, avšak v radiálně uspořádaných řadách bylo možno pozorovat jádra obarvená PI. Obarvení AO ukázalo na skutečnost, že v protoplastu některých buněk je snížené pH, ale anatomie jejich jader obarvených zeleně pomocí SYTO16 se zdála být nezměněná (obr.4.32) V některých řezech z úseků vzdálenějších od kořenové špičky byly buňky obarvené fluoresceinem homogenně (4.33), v jiných byly váčkovité útvary obsahující fluorescein a PI (obr. 4.34). Vždy byly tyto buňky lokalizované poblíž buněk již degradovaných, obdobně jako buňky obarvené EB, které bylo navíc možno pozorovat v těsné blízkosti prorážejících primordií (obr. 4.33).




*Obr. 4.32. Příčné (A, D) a podélné (B, C, E, F) řezy kořenem Phragmites australis ve vzdálenosti 3 cm od kořenové špičky. A – C) - barvení pomocí FDA a PI, D – F) – FDA, AO a SYTO. Kromě v podstatě homogenního zeleného zbarvení pomocí FDA jsou oranžově PI obarvená jádra v řadách sousedních buněk (←) a červenooranžově AO zbarvený protoplast opět v buňkách umístěných v nenáhodných shlucích (★). V těchto buňkách i buňkách k nim přiléhajících je možno vidět jádra zbarvená zeleně pomocí SYTO 16 (⇦).Úsečka = 100 μm*




*Obr. 4.33. Příčné(A, B, D) a podélné (C) řezy kořenem Phragmites australis barvené FDA, PI a AO (A) a Evansovou modří (B, C, D), vzdálenost 6 a více cm od kořenové špičky. Obarvené buňky se nacházej mezi lyzigenně vzniklými aerenchymatickými kanály v primární kůře a v blízkosti kořenových primordií (C, D). Úsečka = 100 μm.*

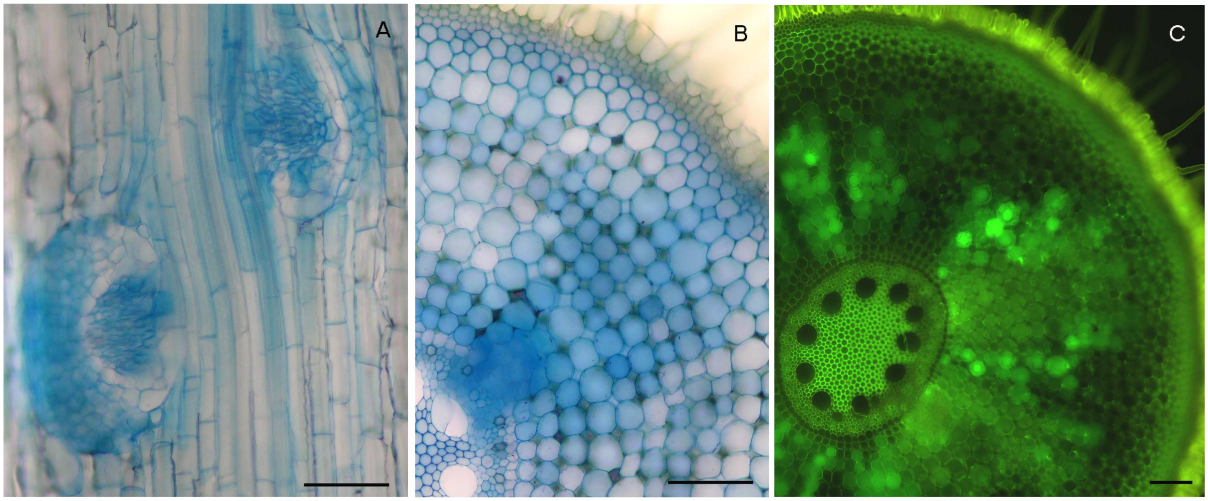



*Obr. 4.34. Podélné (A, B, C) a příčné (D) řezy kořenem Phragmites australis barvené FDA (zeleně) a PI a AO (oranžově), z oblasti kořenové báze. Řezy A) a B) byly vedeny podobně, jak je naznačeno v obr. D) pomocí úseček a) a b).V buňkách přiléhajících k aerenchymatickým kanálům jsou přítomny fluoresceinem obarvené váčky(⇦) svědčící o přítomnosti funkčních esteráz. PI jsou nespecificky obarveny buněčné stěny a částečně i obsah uvedených váčků (←). Úsečka = 100 μm.*

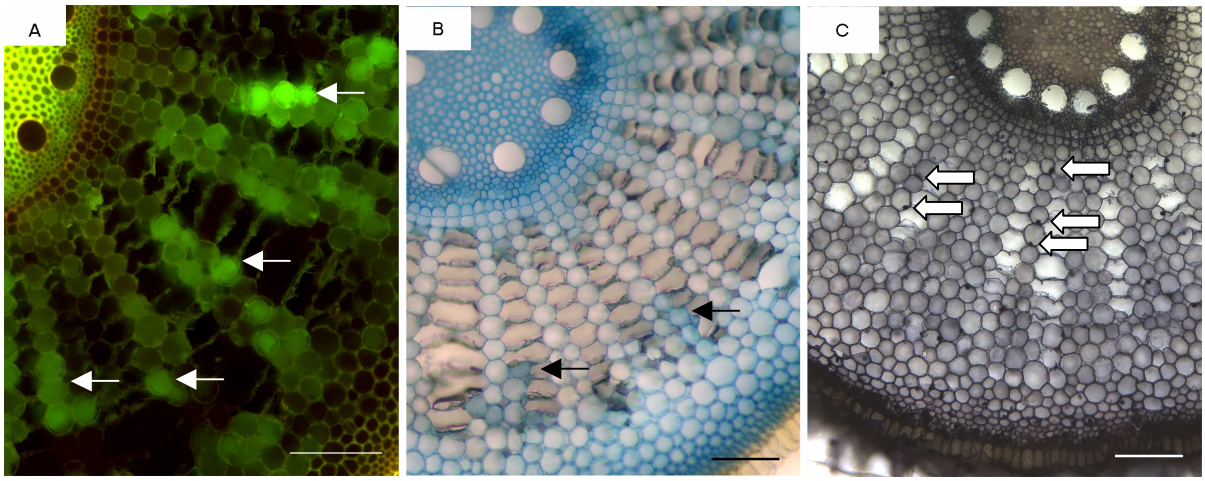
Ostřice úzkolistá, *Carex gracilis*:

Ostřice je další ukázkou mokřadní rostliny, v jejíchž kořenech vzniká lyzigenní aerenchym. Narozdíl od rákosu jsou v její primární kůře pozůstatky buněčných stěn odumřelých buněk uspořádány tangenciálně, v přerušovaných soustředných kruzích kopírujících průběh endodermis.

Po obarvení FDA nebyla lokalizace buněk stejnoměrně zbarvených fluoresceinem náhodná ani zde. Tyto buňky obklopovaly prorážející primordia nebo byly na příčných řezech uspořádány v radiálních řadách, a to jak v dosud neporušené primární kůře, tak i v blízkosti vznikajících aerenchymatických kanálů. Jejich rozmístění vykazovalo podobnost jednak s buňkami obarvenými EB, jednak s buňkami obsahujícími TUNEL-pozitivní jádra (obr. 4.35, 4.36, 4.37). Tyto buňky byly doprovázeny buňkami s jádry obarvenými PI, ačkoli někdy se jednalo o artefakt, neboť se PI-pozitivní jádra vyskytovala v buňkách, jejichž povrch byl evidentně poškozen mechanicky během řezání pletiva (obr. 4.38, 4.39).

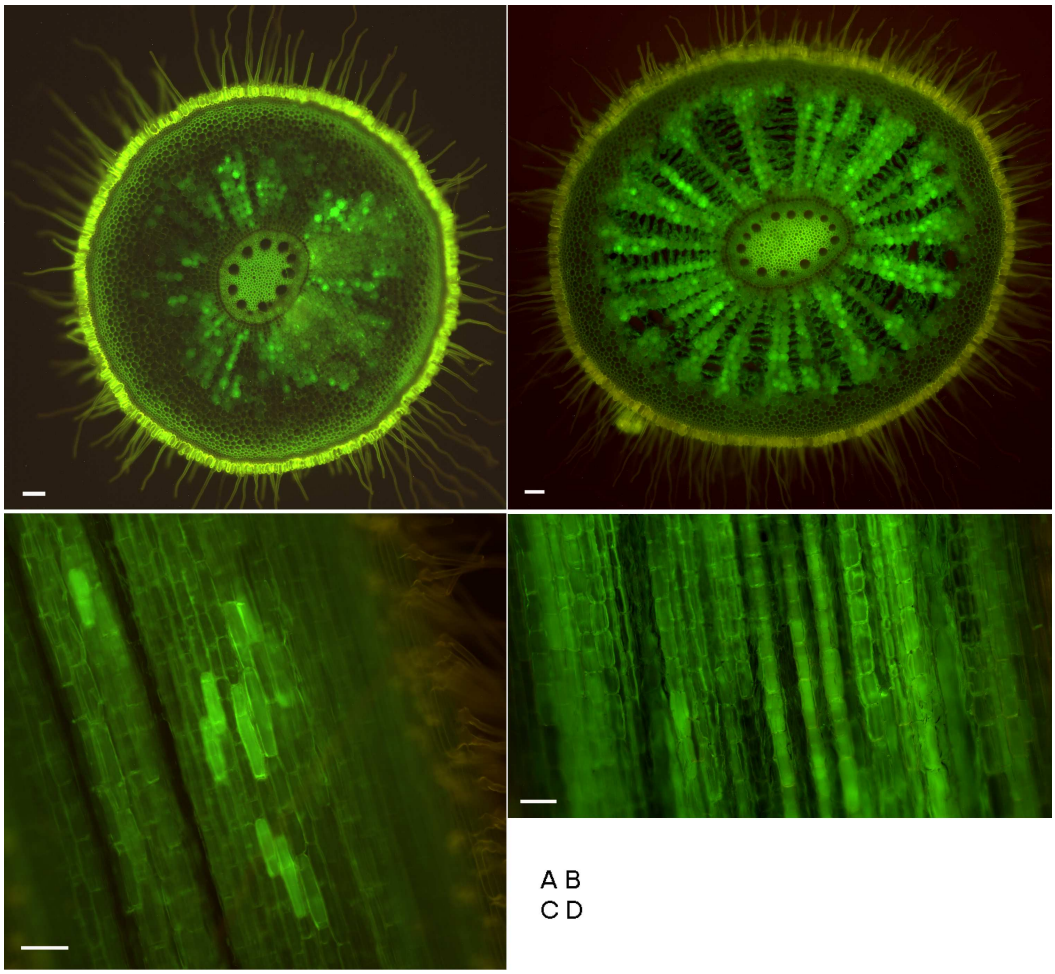



*Obr. 4.35. Podélný (A) a příčné řezy kořenem Carex gracilis barvené Evansovou modří (A,B) a FDA (C), vzdálenost 4 cm od špičky. Obarvené buňky se nacházejí především v primární kůře v blízkosti prorážejících primordií. Úsečka = 100 μm.*

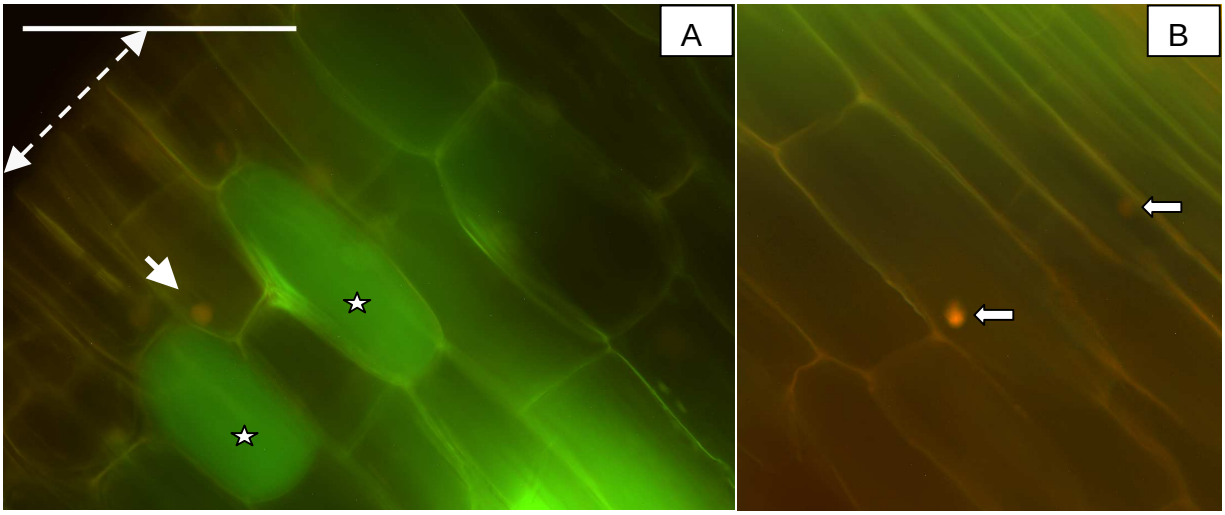



*Obr. 4. 36. Příčné řezy bází kořene Carex gracilis, barvené FDA (A), Evansovou modří (B) a TUNEL-AP (C). Obarvené buňky(⬅) a buňky s TUNEL-pozitivními jádry (⇦) v řadách mezi lyzigenními aerenchymatickými kanály. Úsečka = 100 μm.*

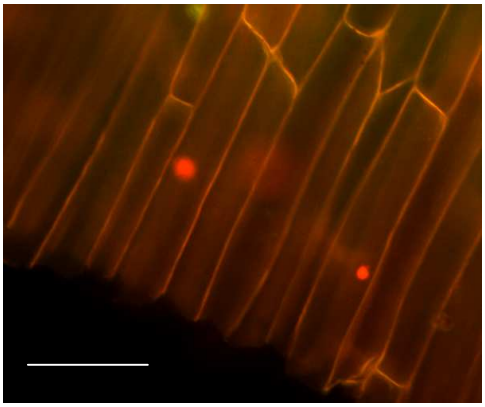
---




*Obr. 4.37, příčné a podélné řezy kořenem Carex gracilis ve vzdálenosti 4 cm od kořenové špičky (A,C) a v oblasti kořenové báze (B,D), barvené FDA. Buňky s aktivními esterázami v radiálních (A,B) i v podélných řadách. Úsečka = 100 μm.*




*Obr. 4.38. Podélný řez kořenem Carex gracilis ve vzdálenosti 4 cm od kořenové špičky, barveno FDA (zeleně) a PI (oranžově). A)V blízkosti buněk s esterázami aktivními v celém objemu (★) se nacházejí buňky s jádry obravenými PI (←). Zde je však porušení plazmatické membrány spíše než vývojovými fyziologickými změnami způsobeno prořezáním buněk při přípravě preparátu (↔). B) Jádra obarvená PI (⇦) v buňkách, u nichž není zjevné mechanické poškození. Úsečka = 100 μm*



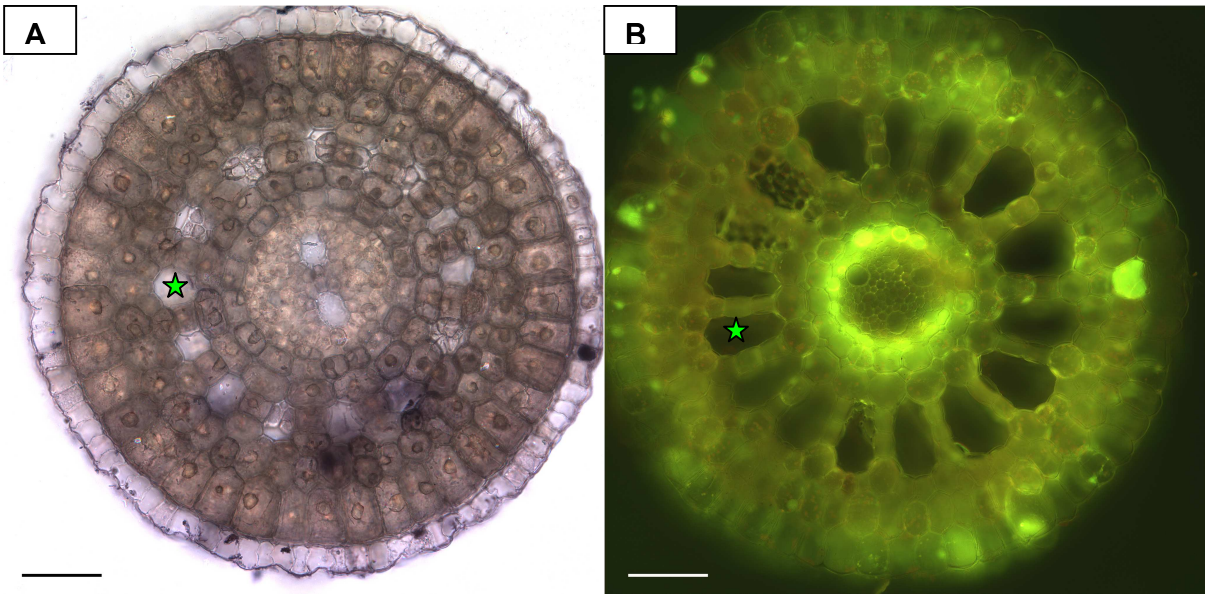
*Obr. 4.39. Podélný řez ze ¾ délky kořene kukuřice obarveného PI. Obarvená jádra zůstávají i v prořezaných buňkách. Úsečka = 100 μm*

Voďanka žabí, *Hydrocharis morsus-ranae*:

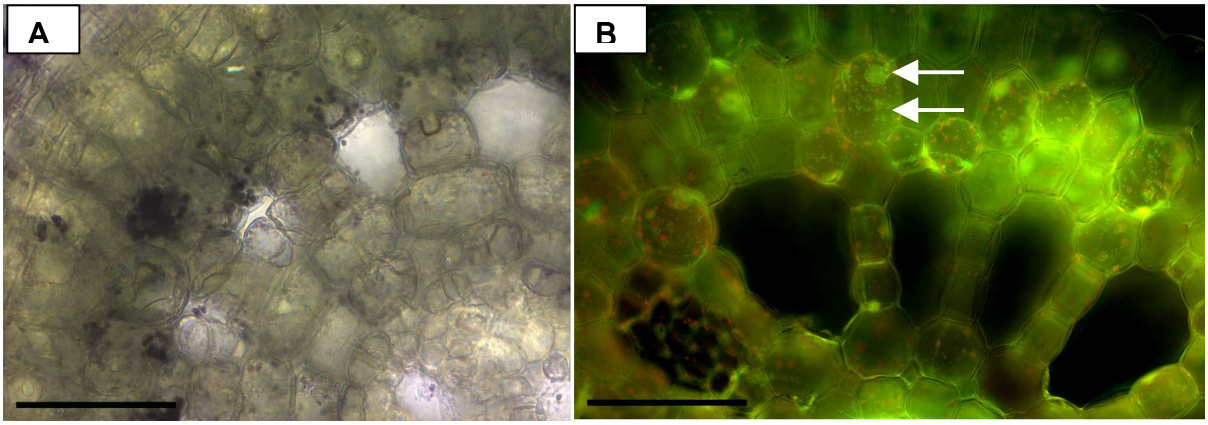
Narozdíl od ostatních rostlin, které byly sledovány, je voďanka žabí spíše než rostlinou mokřadní rostlinou vodní, která podobně jako např. okřehek menší (*Lemna minor*) pokrývá vodní hladinu, na níž vzplývají její listy, zatímco kořeny jsou volně ponořeny pod ní. Jako v předešlých případech, jsou i její kořeny provzdušňovány díky přítomnosti lyzigenního aerenchymu.

Na příčných řezech těmito kořeny bylo však možno pozorovat oproti předchozím rostlinným druhům pouze nevýrazné zbarvení způsobené fluoresceinem, a to i v buňkách lokalizovaných

v oblastech budoucích aerenchymatických kanálů. Spolu s ním zde byla patrná červená autofluorescence chloroplastů. Tvar a umístění těchto organel byly shodné s útvary, které se jevily jako pozitivní po aplikaci TUNEL_AP (obr. 4.40, 4.41).



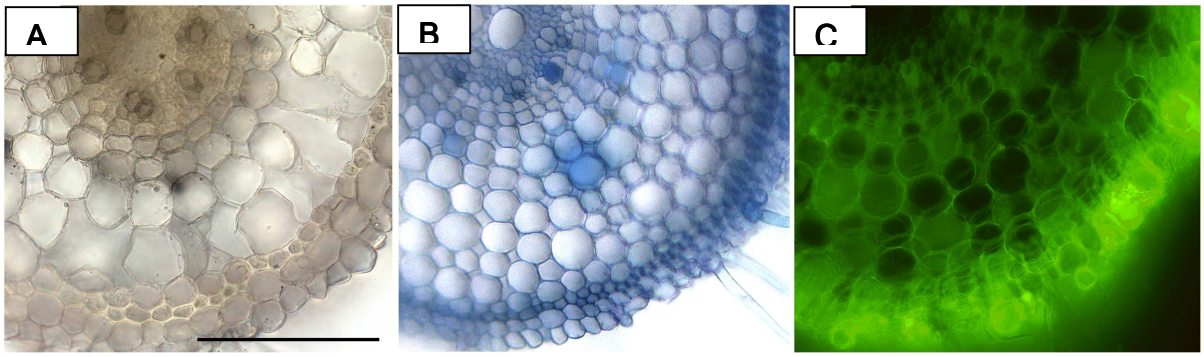

*Obr. 4.40. Příčné řezy 2,5 cm dlouhým kořenem Hydrocharis morsus ranae v oblasti cca 100 (A) a 600 (B) μm od špičky. Snímek ze světlého pole (A) a po barvení FDA (B). * označena místa, kde postupně odumírají kortikální buňky a vzniká aerenchym (srov. A,B). Úsečka = 100 μm.*




*Obr. 4.41. Příčné řezy 2,5 cm dlouhým kořenem Hydrocharis morsus ranae v oblasti cca 100 (A) a 600 (B) μm od špičky. Snímek ze světého pole, barvení TUNEL-AP (A) a po barvení FDA (B). V B) je patrná červená autofluorescence chloroplastů a jemné i větší váčky obarvené FDA (← ), v A) kulovité útvary obarvené TUNEL-AP. Úsečka = 100 μm*

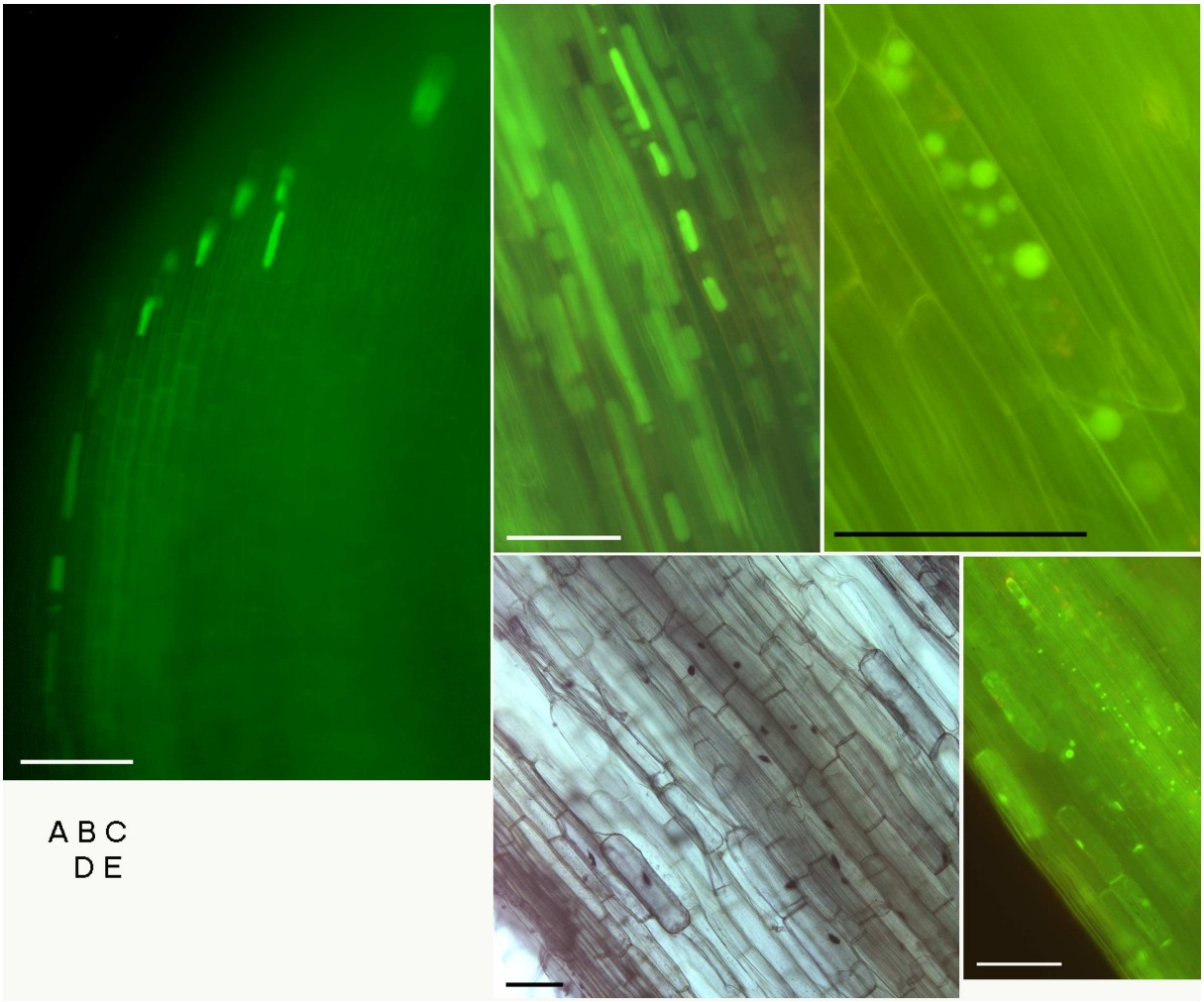
Rýže setá, *Oryza sativa*:

Rýže setá opět patří mezi rostliny s lyzigenním typem aerenchymu. Při našich pokusech se lokalizace buněk obarvených EB nedala označit přesněji než jako „střední vrstvy primární kůry", což se kryje s místy, kde později vznikají aerenchymatické kanály. Podobně bylo možno definovat i umístění buněk s obsahem homogenně obarveným fluoresceinem po použití FDA, které však bylo málo výrazné (obr. 4.42).




*Obr. 4.42. Příčné řezy 4 dny (A) nebo 1 den (B,C) starými částmi kořene devítidenních rostlin rýže. A) – obraz ve světlém poli, B) –barvení Evansovou modří , C) – barvení pomocí FDA. Úsečka = 100 μm*

Na podélných řezech kořeny klíčních rostlin rýže ošetřených FDA pak bylo možno najít buňky celistvě zbarvené fluoresceinem, ale i buňky, v nichž se vyskytovaly fluoresceinem obarvené váčky. Umístěny byly jednak v oblasti středního válce, jednak v primární kůře, podobně jako buňky s TUNEL-pozitivními jádry. Fluoresceinem „svítící" buňky byly nalezeny také na okraji koleoptile sledovaných rostlin (obr. 4.43).

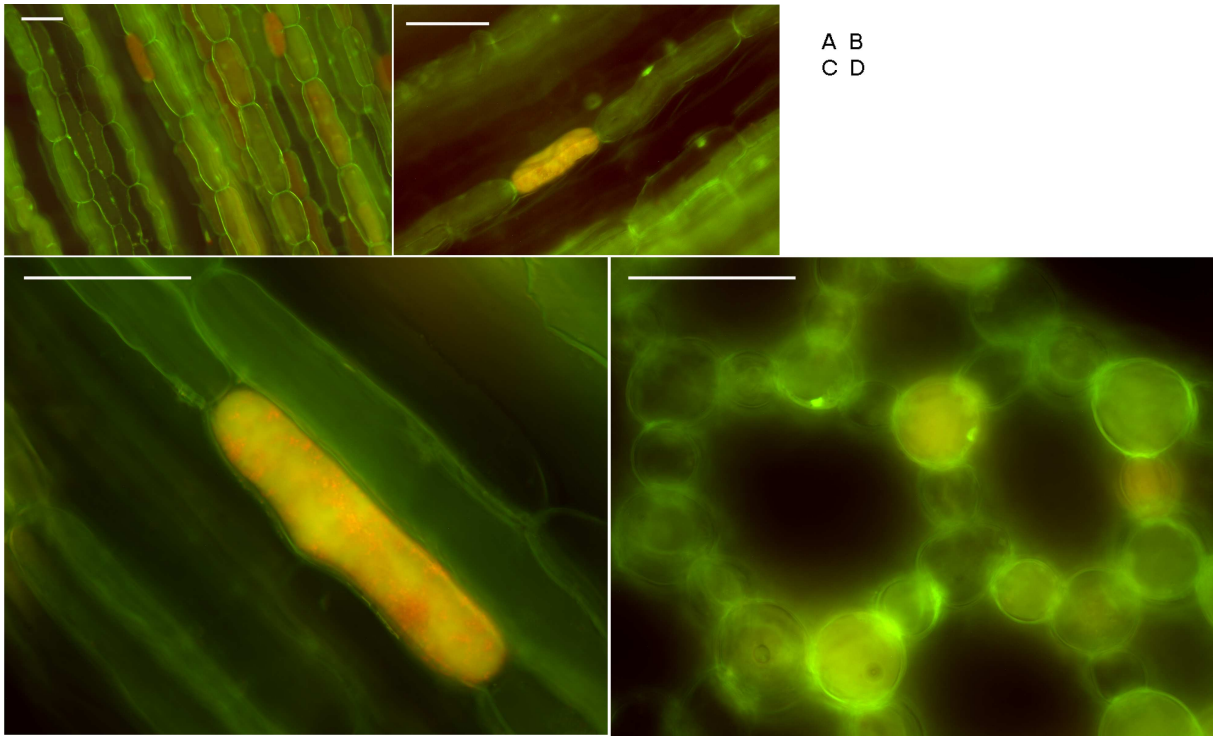



*Obr. 4.43. B-E – podélné řezy 1 den starými částmi kořene devítidenních rostlin rýže. A) – koleoptile stejně staré rostliny. A, B, C, E – barvení pomocí FDA, buňky s váčky (C) nebo celými protoplasty obarvenými fluoresceinem. D – TUNEL-AP, buňky primární kůry a středního válce, podobně jako v E. Úsečka = 100 μm, C) úsečka = 50 μm.*

---

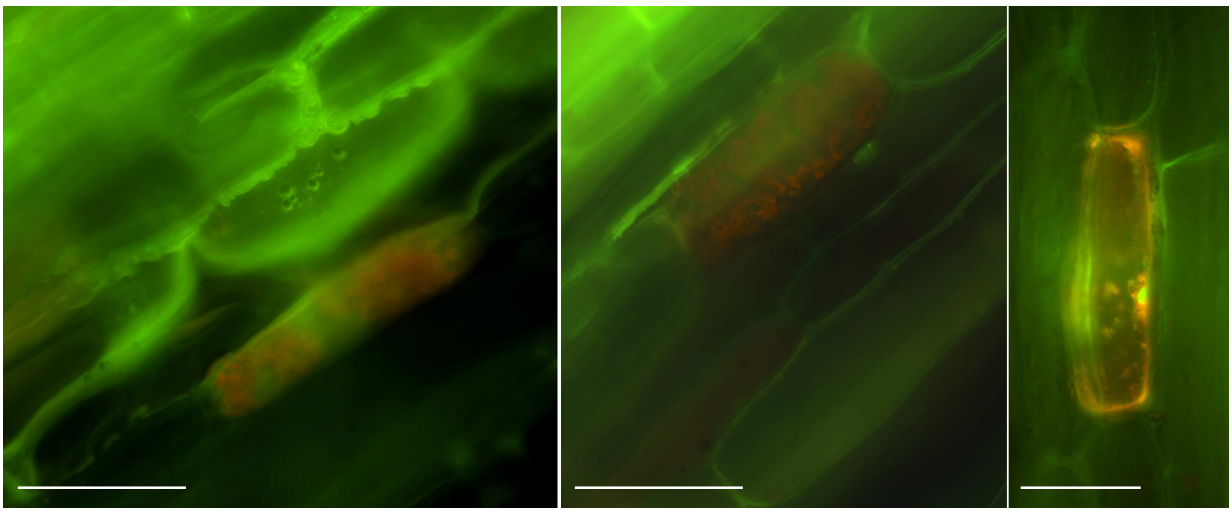
Puškvorec obecný, *Acorus calamus*:

Puškvorec obecný je příkladem mokřadní rostliny, v jejíchž kořenech se aerenchym tvoří schizogenně, tedy rozestoupením a specifickým dělením kortikálních buněk. Přesto bylo možno v jeho kortikálních buňkách pozorovat určité fyziologické změny projevující se oranžovo-červeným zabarvením. Obarvení jader pomocí PI nebylo patrné v žádných kortikálních buňkách (obr. 4.44, 4,45).




*Obr. 4.44. Příčný (D) a podélné řezy kořenem Acorus calamus v oblasti báze (C) a ve vzdálenosti 3 (A,B) a 6 cm od kořenové špičky (D). Barveno prostřednictvím FDA a SYTO (zeleně) a PI a AO (oranžově). Oranžově jsou zbarveny pravděpodobně buňky označované jako idioblasty. Úsečka = 100 μm.*

---



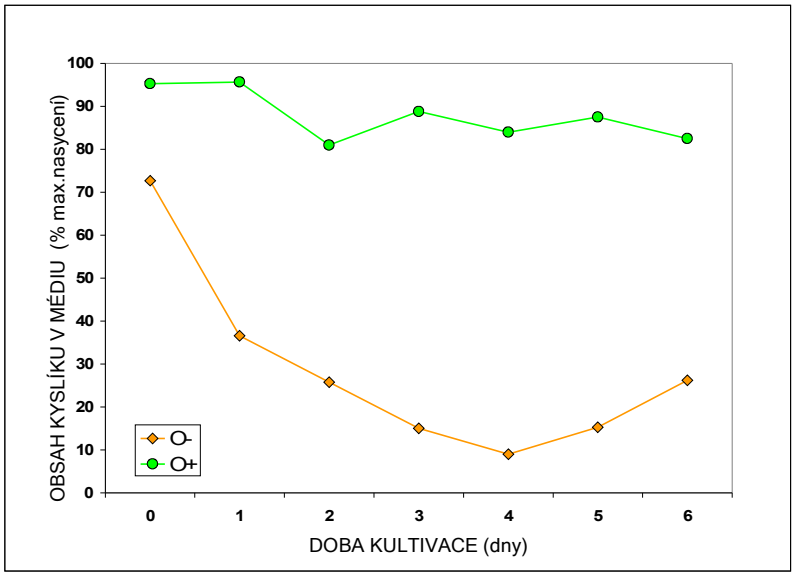
*Obr. 4.45. Detail předpokládaných idioblastů na podélných řezech kořenem Acorus calamus barvených pomocí FDA, SYTO, PI a AO. Červenooranžové zbarvení je způsobeno AO, jedná se pravděpodobně o cytoplazmu se sníženým pH, případně o váčky, jejichž obsah je kyselý a membrána pro AO prostupná. Úsečka = 100 μm.*

---

# 5 DISKUSE

## 5.1 Tvorba aerenchymu v kořenech kukuřice, vliv kultivaru a kultivačních podmínek

Kukuřice setá je označována jako rostlina s indukovanou tvorbou aerenchymu. Degradace některých kortikálních buněk je zahájena působením vnějšího spouštěče, většinou ve formě stresového působení (zaplavení, mechanické bariéry, změna dostupnosti některých živin či působení exogenního etylénu), (He et al. 1996b;Drew et al. 1989;Drew et al. 2000;Gunawardena et al. 2001;Bouranis et al. 2003;Bouranis et al. 2006). V předchozích pokusech (Lenochová 2004) se však kukuřice jevila jako rostlina tvořící aerenchym bez ohledu na okolní podmínky (např. jak v provzdušňovaném, tak neprovzdušňovaném živném roztoku, obr. 4.2, 5.1), které dokázaly ovlivnit jen míru nebo načasování jeho rozvoje. Jelikož při reakci rostliny na stres může hrát významnou roli genotyp, bylo zjišťováno, jak je tomu v případě tvorby aerenchymu u dvanácti různých kultivarů kukuřice.




*0br. 5.1. Změny množství kyslíku v provzdušňované (O+) a neprovzdušňované (O-) hydroponické kultivaci kukuřice v průběhu 6 dnů (Lenochová 2004)*

Zatímco Mano et al. (2006) při podobném pokusu s patnácti kultivary pěstovanými v zaplaveném a nezaplaveném substrátu odhalili konstitutivní tvorbu aerenchymu v adventivních kořenech jen u dvou z nich, v našem případě aerenchymatické kanály ve ¾ délky primárního kořene (měřeno od kořenové špičky) ani u jedné ze všech zkoumaných rostlin pěstovaných ve vlhkém perlitu nechyběly (tab. 4.1). Rozdíl může však být dán právě

tím, že se jednalo o různé typy kořenů. Odpovědí na zaplavení může být i samotná tvorba adventivních kořenů (Mano et al. 2006), a tak je možné, že pokud není rostlina takovým podmínkám vystavena, její adventivní kořeny mají jinou funkci a tvorba kanálů v jejich primární kůře pro rostlinu žádný význam nemá. Autoři si rovněž všimli, že pokud jsou rostliny pěstovány v mělkých květináčích, kde se jejich kořeny tísní, aerenchym se tvoří u mnoha linií. V kultivacích použitých pro předkládanou práci se však jednalo o mladé rostliny pěstované pouze týden v dostatečně velkých nádobách, takže nedostatek prostoru by zde neměl být spouštěčem tvorby aerenchymu. Bouranis et al. (2006), kteří zkoumali vliv nedostatku síry na tvorbu aerenchymu v adventivních kořenech kukuřice, zjistili, že při pěstování v dobře provzdušňovaném médiu se tvoří aerenchym jak ve stresovaných, tak v menším měřítku i v kontrolních rostlinách.

Vzhledem k tomu, že uvedené kultivace probíhaly v letních měsících, stojí za zmínku výsledky práce Dunn (1921), ač nejsou zrovna nejnovějšího data. Autorka si všimla, že „okénka“ v primárních kořenech kukuřice vznikají jak v hydroponii, tak při kultivaci v půdě či písku. U pěstování v pevném substrátu však hrálo roli, kdy se kultivace odehrávala. Zatímco v letních měsících se kořeny chovaly popsaným způsobem, u rostlin pěstovaných v zimních měsících byla „okénka“ hledána marně. Toto zjištění pravděpodobně nelze generalizovat jako odpověď na neshody panující v otázce konstitutivní či indukované tvorby aerenchymu u kukuřice, ale jistě stojí nejen za povšimnutí, ale i za zamyšlení nad tím, co všechno může ovlivňovat chování živých organismů, ač je s nimi nakládáno v přísně střežených laboratorních podmínkách. Mimo to může být někdy přínosné nahlédnout i do ne zrovna nejnovějších prací.

**Kromě zjištění, že se aerenchym tvoří v primárních kořenech všech námi sledovaných kultivarů kukuřice, posloužila tato anatomická studie i k tomu, že byl pro další pokusy vybrán kultivar Cefran coby genotyp s nejpravidelněji uspořádanou primární kůrou.**

V definovaných úsecích kořenů tohoto kultivaru bylo obrazovou analýzou zjištěno zastoupení aerenchymu a jeho plocha byla korelována s délkou kořenů, výsledkem byla přímá úměrnost (obr. 4.1).

**Jako spolehlivější indikátor pro stádium tvorby aerenchymu se ukázala délka kořene než jeho stáří, neboť délky kořenů stejného stáří se mnohdy výrazně lišily.**

Pro další výzkum byly tedy odebírány vzorky podle vzdálenosti od kořenové špičky, ač u velmi mladých kořenů je patrná i korelace se stářím, obr. 4.2.

Uvedená závislost je v souladu se zjištěním Aguilar et al. (1999), kteří sledovali čtyři kultivary banánovníku za účelem nalezení genotypu vhodného pro pěstování v zaplavovaných oblastech. Jejich závěrem bylo to, že plocha konstitutivně vznikajícího aerenchymu je přímo úměrná délce kořenů, přičemž výsledná vodivost je vždy v podstatě stejná. Jako zemědělsky vhodnější byly proto označeny rostliny s kratšími a méně porézními kořeny, jejichž stavba je méně náchylná k množení a systémovému šíření patogenů, např. houby rodu *Fusarium*, která ohrožuje banánovníky nejvíce v období dešťů. Korelace délky kořenů a plochy aerenchymu byla popsána i v již zmíněné práci Dunn (1921), kde je kromě toho tato závislost označována jako významnější než závislost plochy aerenchymu na stáří kořene. Stejné závěry vyplývají i z prací Justin and Armstrong (1987) a Justin and Armstrong (1991), kteří tuto závistost pozorovali na kořenech kukuřice a rýže.

Při pozorování kořenů rostlin z různých kultivačních podmínek si však můžeme všimnout, že kořeny vystavené stresu (neprovzdušňovaný živný roztok, zaplavený substrát) jsou nejen poréznější (obr. 4.2), ale i kratší. Takový trend, tedy pomalejší růst vysoce porézních kořenů, pravděpodobně v důsledku diferenciace pletiv včetně aerenchymu blíže kořenové špičce (Rost 1994), byl popsán u různých rostlinných druhů, např. u *Zea mays, Oryza sativa*, *Juncus effusus, Caltha palustris, Carex palustris, Ranunculus sceleratus, Rumex palustris*, (Justin and Armstrong 1991;Brailsford et al. 1993;Visser et al. 2000;Enstone and Peterson 2005).

Tvorba lyzigenního aerenchymu je spojena s působením etylénu (Justin and Armstrong 1991;He et al. 1996a;Drew et al. 2000;Gunawardena et al. 2001;Colmer et al. 2006).

Tato souvislost byla potvrzena použitím AOA, inhibitoru ACC-syntázy. Působení 200 $\mu$M AOA (koncentrace zvolena podle Peng et al., 2001) omezilo růst kořenů a zastoupení aerenchymu v nich snížilo téměř na nulu, což je v souladu s výše popsanou korelací mezi délkou kořenů z jedné kultivace a množstvím v nich zastoupeného aerenchymu.

Aplikace exogenního etylénu může, podobně jako snížená koncentrace kyslíku v rhizosféře, spustit nebo podpořit vznik aerenchymu v rostlinách, kde se toto pletivo běžně netvoří (např. kukuřice setá, (Gunawardena et al. 2001) nebo je jeho rozsah menší (např. rýže, (Colmer et al. 2006). Rovněž se zablokování syntézy endogenního etylénu projeví snížením nebo úplnou inhibicí tvorby aerenchymu, což bylo pozorováno např. u rýže (Justin and Armstrong 1991).

To, že je s tvorbou aerenchymu u kukuřice úzce spojena činnost etylénu, naznačují např. výsledky Geisler-Lee et al. (2010), kteří sledovali u rostlin pěstovaných v hypoxii expresi genů, jejichž produkty jsou zapojeny do syntetické dráhy vedoucí k etylénu. Prokázali, že se v takových případech zvýšila tvorba ACC-oxidázy v sítkových elementech, buňkách

průvodních, buňkách kořenové čepičky a primární kůry, a zároveň se zvýšila produkce ACC-syntázy v kořenové čepičce a primární kůře. Anatomicky se buňky v daných oblastech vyznačovaly „řidší cytoplazmou“, tedy pravděpodobně zvětšováním vakuoly vzhledem ke zbytku buňky. Díky uvedeným změnám v obsahu zmíněných enzymů se v hypoxii zvýšila tvorba etylénu a v důsledku toho se zpomalil kořenový růst.

Při pokusu o využití klíčícího hrachu jako indikátoru hladiny etylénu při kultivaci kukuřice za různých podmínek bylo vedlejším efektem srovnání morfologických a anatomických charakteristik kukuřice pěstované za světla a potmě. Temnostní kultivace byly použity, neboť pro tzv. „tripple response“ musí být hrachové rostliny etiolované. Na působení etylénu reagují omezením růstové rychlosti, natékáním hypokotylu a horizontálním růstem (Arshad and Frankenberger 1988). Zatímco výsledek využití hrachu pro tyto účely byl neuspokojivý, srovnání růstových charakteristik a porozity kukuřičných kořenů se ukázalo jako přínosnější. Rostliny ze zatemněné kultivace byly charakterizovány delšími kořeny i prýty a výrazně vyšší porozitou ve srovnání s rostlinami pěstovanými za normální fotoperiody. Po aplikaci 200 $\mu$ M AOA byl rozvoj aerenchymu méně omezen v etiolovaných rostlinách kukuřice než v rostlinách pěstovaných za běžné fotoperiody, jeho tvorba byla v temnostních kultivacích plně blokována až působením 900 $\mu$ M AOA.

Lze předpokládat, že snížená tvorba aerenchymu souvisí s působením AOA, ale není zřejmé, zda jsou rozdíly v důsledcích jeho působení dány tím, že se produkce etylénu liší za světla a ve tmě, podobně jako u *Sorghum bicolor* (Finlayson et al. 2004), nebo zda je na vině zvýšená citlivost k etylénu v průběhu temné periody. Je možné, že u kukuřice se jedná právě o druhou z uvedených variant, soudě podle obdobného efektu dusíkové a fosfátové deficience na senzitivitu k etylénu (Drew et al. 1989).

Bylo opakovaně prokázáno, že množství endogenního etylénu kolísá v závislosti na denní době, ačkoli se průběh těchto fluktuací u různých rostlin liší. Zatímco někteří autoři popisují pokles produkce etylénu v temnostní fázi denního cyklu, např. u *Impatiens balsamina* (Michalczuk and Rudnicki 1993), *Chenopodium rubrum* (Machackova et al. 1997) nebo *Phaseolus sp*. (Vangronsveld et al. 1988), jiní předkládají opačné závěry, např. (Finlayson et al. 1998;Finlayson et al. 2004) u *Sorghum bicolor*.

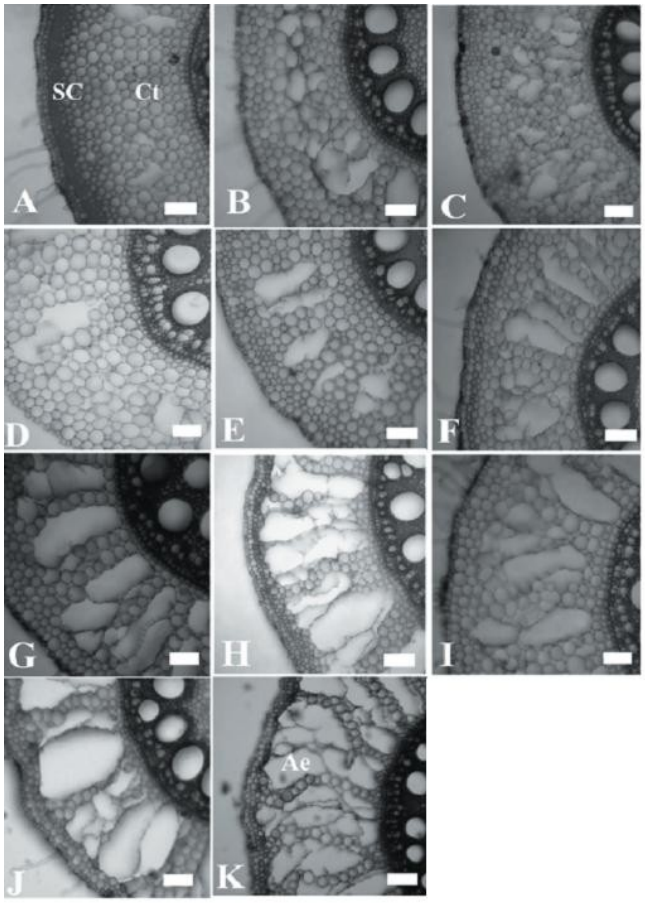
Působení etylénu se mj. projevuje i změnou růstu jednotlivých rostlinných orgánů. Ačkoli u většiny rostlin je jeho efekt inhibiční, rostliny adaptované na zaplavení jsou v tomto ohledu obecnou výjimkou. K podpoře růstu tak vede jeho zvýšená tvorba např. u hlubinné rýže (Metraux and Kende 1983) nebo u šťovíku (Voesenek and Blom 1989). Tyto údaje jsou tedy

v souladu s výše popsanými výsledky s pěstováním kukuřice ve tmě. Nelze však jednoznačně tvrdit, že u kukuřice jde v případě intenzivnějšího růstu a zvýšené tvorby aerenchymu o důsledek nárůstu produkce etylénu. Příčinou mohou být i jiné mechanismy, které doprovázejí vývoj etiolovaných rostlin, které jsou přizpůsobené k zaplavení.

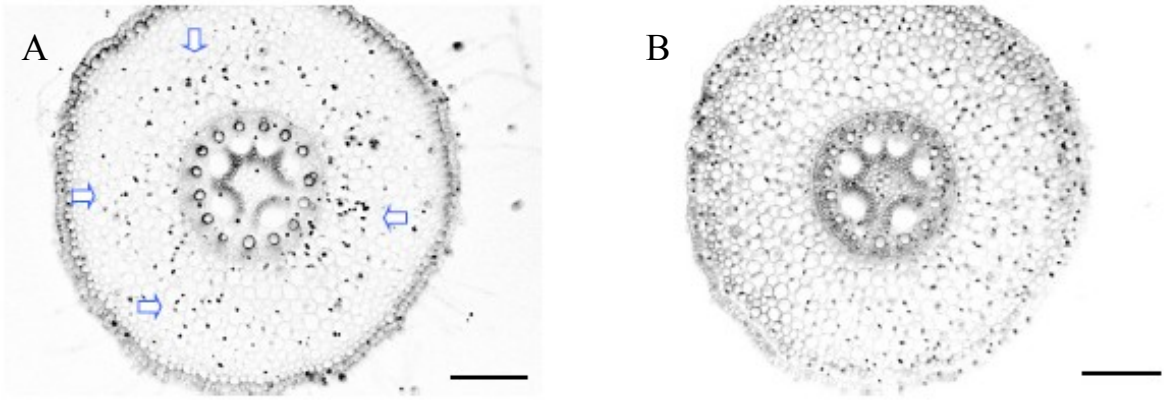
Odpovědí na otázky týkající se změn v produkci etylénu může být transkripční faktor RAP2.2 z *Arabidopsis thaliana*, jehož exprese je podpořena působením etylénu. Hinz et al. (2010) zjistili, že jeho syntéza je kromě toho ovlivněná tmou a že jeho aktivita zvyšuje schopnost rostliny přežít v hypoxických podmínkách, zatímco rostliny, u nichž byl gen pro tento faktor vyřazen z činnosti, jsou při kyslíkovém stresu výrazně méně životaschopné. Tento protein se uplatňuje při řízení drah vedoucích k enzymům cukerného metabolismu a zpětně i k syntéze etylénu. Je možné, že zde, stejně jako v popsaných pozorováních u kukuřice, jde o souvislost snížené dostupnosti kyslíku a omezení dopadajícího světla jako podmínek, které mohou na fyziologické změny v rostlině působit společně, dost možná proto, že se v přírodě mohou vyskytovat zároveň.

Použití AOA mělo posloužit k propojení výše uvedených skutečností, a sice faktu, že tvorba lyzigenního aerenchymu je považována za případ rostlinné PCD prokazatelné mj. TUNEL reakcí (Gunawardena et al. 2001), se zjištěním, že etylén hraje klíčovou roli právě při utváření tohoto pletiva (Colmer et al. 2006). Byla potvrzena souvislost výskytu aerenchymu s lokalizací TUNEL-pozitivních jader a vliv AOA nejen na zastoupení aerenchymu, ale i na počet TUNEL-pozitivních jader. Jejich množství bylo výrazně vyšší v kořenech rostlin z běžných kultivací než v kořenech rostlin ošetřených AOA (obr. 4.17, viz dále). Nejvíce TUNEL-pozitivních jader bylo nalezeno ve 3. až 6. vrstvě primární kůry, což je v souladu s lokalizací aerenchymatických kanálů (Drew et al. 2000;Bouranis et al. 2003). Komplikací pro další výzkum bylo to, že se nepodařilo přesněji určit vrstvu, ve které by odumírání buněk začalo. Oproti tomu u rýže je počátek tvorby aerenchymu lokalizován jasně. Příčinou může být to, že rýže má, alespoň v případě některých kultivarů, ve srovnání s kukuřicí pravidelněji uspořádanou primární kůru (Kawai et al. 1998). Jak bylo uvedeno výše, relativně velmi přehledně uspořádanou primární kůru má kultivar Cefran, jehož strukturu lze přirovnat např. k výsledkům (de Souza et al. 2009). Ti postupně z rostlin pěstovaných v zaplavení vybírali ty s větší plochou aerenchymu. Na obr. 5.2 je patrné nejen zvětšování plochy aerenchymu, ale i změny uspořádání živých kortikálních buněk, které u rostlin z prvních selekčních cyklů působí chaoticky a náhodně (B), u rostlin s plně vyvinutým aerenchymem již tvoří spojité, poněkud křivolaké provazce (K).

I přes popsaný charakter primární kůry kukuřice, který může být z hlediska anatomických výzkumů považován za „nedostatek“, můžeme konstatovat, že TUNEL-pozitivní jádra na příčných řezech kořeny kukuřice cv. Cefran jsou uspořádána v paprsčitě organizovaných shlucích, což zde odpovídá rozmístění aerenchymu (obr. 4.18). Obdobné shluky byly pozorovány rovněž u kultivaru CE 240, jehož primární kůra je charakterizována ještě výrazně nižší mírou uspořádanosti (obr. 5.3, (Lenochová 2004).




*Obr. 5.2. Příčné řezy kořenem rostlin kukuřice cv. Saracura vybíraných postupně z kultivací v zaplavení. Ct = kortex, a = aerenchym, SC = suberinizované buňky (tj. exodermis). Úsečka = 100 μm. (de Souza et al. 2009).*




*Obr. 5.3. Srovnání rozmístění TUNEL-pozitivních jader (A) a jader označených pomocí DAPI (tedy všech jader, B) v primární kůře kořene kukuřice kultivaru CE 240 pěstované v hydroponii. Řezy ze vzdálenosti 5mm od kořenové špičky. Šipky ukazují na shluky TUNEL-pozitivních jader, úsečka = 250 μm.*

---

Ze zjištění, že role etylénu souvisí jak s tvorbou aerenchymu, tak s výskytem TUNEL-pozitivních jader (obr. 4.17), lze vyvodit, že se při odumírání buněk provázejícím vznik lyzigenního aerenchymu uplatňuje specifické štěpení DNA typické pro PCD. To se shoduje s daty uvedenými v práci Gunawardena et al. (2001), kde je v primárních kořenech kukuřice popisována indukce tvorby aerenchymu včetně pozorované přítomnosti TUNEL-pozitivních jader po aplikaci exogenního etylénu. V této práci se však autoři nezabývají souvislostí jejich distribuce a pozdější lokalizace aerenchymu.

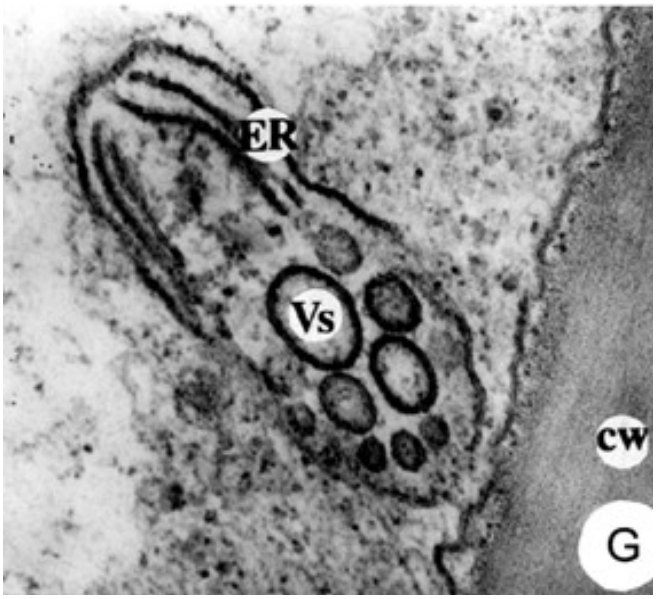
Produkci endogenního etylénu a aktivitu enzymů nutných pro jeho syntézu měřili (He et al. 1996a) v seminálních kořenech rostlin kukuřice vystavených hypoxii a našli vztah mezi těmito látkami a tvorbou aerenchymu, doprovázenou ještě aktivitou celuláz, tedy enzymů zahrnutých do odbourávání buněčných stěn.

**Lze tedy shrnout, že vznik aerenchymu u kukuřice souvisí s přítomností etylénu, je ovlivněn světelnými podmínkami a vytvořené kanály kolokalizují s místy, kde se vyskytují buňky vykazující znaky PCD.**

Přestože u výsledků TUNEL reakce do jisté míry může jít o artefakty (důsledek přípravy vzorků, mikroskopování, dokonce i nekrotických změn, viz pasáž věnovaná optimalizaci TUNEL reakce), jsou uvedená data (lokalizace a zastoupení TUNEL-pozitivních jader, obr. 4.17, 4.18) konzistentní s původním výzkumem, kde byly ve sledovaných oblastech pozorovány i ultrastrukturní změny charakteristické pro některé typy rostlinné PCD (obr. 2.9,

Lenochova et al., 2009) a náznak apoptotických žebříčků (Lenochová 2004). Ze změn pozorovaných prostřednictvím TEM jmenujme např. smršťování protoplastu a plazmalemy, fragmentaci protoplastu a jeho uzavírání do váčků ohraničených plazmalemou, někdy obsahujících menší váčky pokryté útvary připomínajícími ribosomy (cf. s obr. 5.4, (Gupta 2007). Jejich obsah pravděpodobně postupně podléhá degradaci v důsledku vylití vakuolárních enzymů, což je následováno degradaci buněčných stěn. Obdobný průběh rostlinné PCD popisuje např. Gunawardena et al. (2004) u rostliny *Aponogeton madagascariensis* v průběhu tvorby listových perforací (viz Literární úvod).

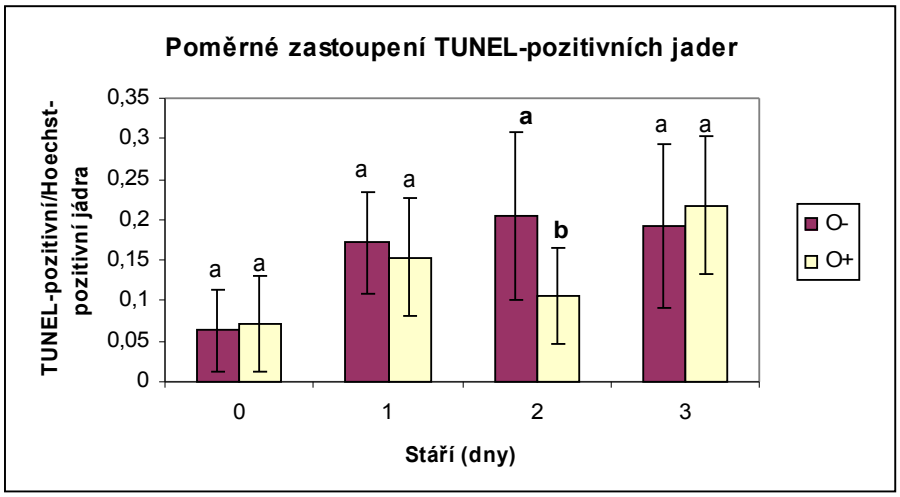
Uvedená ultrastrukturní pozorování je dále možné srovnat s výsledky fluorescenčních metod, viz níže.




*Obr. 5.4. Membránou ohraničené váčky vyskytující se v blízkosti plazmalemy v buňkách embryonální kultury Dactylis glomerata vystavené osmotickému stresu pomocí NaCl. Cw = buněčná stěna, Vs = váček, ER = endoplazmatické retikulum. 30 000 krát zvětšeno. (Gupta 2007) .*

## 5.2 Optimalizace metody TUNEL

Během výzkumu, jehož výsledky jsou v této práci předkládány, začala TUNEL reakce dávat nekonzistentní výstupy. Bylo proto třeba tuto metodu nově optimalizovat, ač se aplikovaný postup podle (Jones et al. 2001) v dřívějších pokusech osvědčil, a to jak za použití TUNEL-TMR, tak TUNEL-FITC (Kuthanova et al. 2004;Kuthanova et al. 2008b;Lenochová et al. 2004;Kuthanova et al. 2008a). Novým problémem bylo to, že bylo obtížné odlišit intenzitu fluorescence TUNEL-pozitivních jader od jader ostatních, neboť převážná většina jader byla obarvena, bez ohledu na použité ošetření (tj. TUNEL-TMR nebo TUNEL-AP). Zatímco poměrné zastoupení TUNEL-pozitivních jader na příčných řezech kořeny kukuřice se v předchozích pokusech prováděných pomocí TUNEL-TMR pohybovalo kolem 20 % (viz obr. 5.5, (Lenochová 2004), v pokusech pozdějších jejich počet přesáhl 80 % všech jader (obr. 4.9). U žádné z variant nebyl zjištěn rozdíl mezi zastoupením TUNEL-pozitivních jader ve sledovaných vzorcích a v pozitivní kontrole (s DNA naštípanou pomocí nukleázy). Stejně jako preparáty připravené z kořenů kukuřice se chovaly i vzorky z tabákové buněčné kultury BY-2 stresované 50 μM Cd, které se v podstatě nelišily od preparátů připravených z buněk nestresovaných (cf. obr. 4.3. a 4.4, dále 4.5, 4.8. – 4.11.). Pro statistické zpracování byly použity pouze varianty z kořenů kukuřice, buněčné kultury sloužily pouze coby semikvantitativní kontrolní vzorky.




*Obr. 5.5. Poměrné zastoupení TUNEL-pozitivních jader v primární kůře kořenů kukuřice pěstované v provzdušňovaném(O+) a neprovzdušňovaném (O-) kultivačním roztoku (Lenochová 2004).*

Ke snížení počtu TUNEL-pozitivních jader nevedlo ani vynechání nebo úprava kroků, které mohly teoreticky způsobit zlomy v molekule DNA (kyselé složky fixáží, příliš dlouhé působení Tritonu, enzymů, vysoké teploty v průběhu přípravy vzorků atd. (Anonymous 2005;Anonymous 2006). S podobnými problémy, tedy s nespecifickým značením jader

pomocí TUNEL reakce, se zjevně potýkaly i jiné výzkumné skupiny, což je patrné např. z diskuse na serveru Histonet listserver (www.histonet.org). Někteří z jeho uživatelů se odvolávají na své starší výsledky a na jejich odlišnost od výsledků nových, získaných na stejném materiálu beze změny metodiky (Akima 2005;Blount 2005;Lhotak 2005;Detmar 2006;Kladnik 2007). Mezi navrhovanými řešeními je jak naprosté upuštění od metody TUNEL (O'Connor 2004;Edwards 2005), tak využití chemikálií od různých výrobců (Lhotak 2005) a naředění enzymatických směsí (Gonzales 2005). Jiní autoři varují před autofluorescencí rostlinného materiálu, ale zároveň upozorňují, že odbourání buněčných stěn pomocí celuláz a pektináz může být riskantní, neboť součástí těchto enzymů bývají stopy jiných enzymů včetně nukleáz, což je pro použití při TUNEL reakci nežádoucí (Fath et al. 1999).

Ve snaze vyhnout se chybné interpretaci autofluorescence a na základě dobrých předchozích zkušeností (Lenochova et al. 2009) byla zvolena varianta TUNEL-AP, kde jsou TUNEL-pozitivní jádra sledována ve světlém poli nebo jako temné body na fluorescenčním pozadí (v případě AP, kdy je výhodou skutečnost, že je možné pozorovat najednou jádra TUNEL-pozitivní i jádra obarvená pouze DAPI). Takto získané výsledky se však nijak nelišily od výsledků z varianty AP-fluo, kdy byly vzorky sledovány pod fluorescencí ještě před navázáním protilátek proti fluoresceinu. Nakonec se vhodným řešením pro uvedené problémy s nespecifickým značením pomocí TUNEL-AP i TUNEL-TMR ukázalo být dvacetinásobné ředění enzymatické směsi (viz obr. 4.10, 4.12), což naznačuje, že účinky TUNEL kitů od firmy Roche mohly být v inkriminované době silnější než dříve, pravděpodobně v důsledku vyšších koncentrací enzymatických směsí.

Jak bylo uvedeno výše, v žádné z použitých variant TUNEL reakce se nelišily zkoumané vzorky od svých pozitivních kontrol, pokud nebyla enzymatická směs naředěna. Přesto, jak je patrné z obr. 4.7, je signifikantní rozdíl mezi relativním zastoupením jader obarvených pomocí TUNEL-TMR a TUNEL-AP (varianty AP i AP fluo). Rozdíl je rovněž mezi frakcí TUNEL-pozitivních jader v příčných a podélných řezech. Do třetice, další rozdíly v poměrném zastoupení TUNEL-pozitivních jader je možné pozorovat u varianty AP-fluo, pokud se zaměříme na dvě různé roviny ostření. Zatímco povrchová vrstva příčných řezů je na TUNEL-pozitivní jádra bohatá, ve vrstvách hlubších tato jádra téměř nenajdeme, což je ještě patrnější na řezech podélných (obr. 4.13 – 4.15). Z uvedeného vyplývá, že obě TUNEL směsi pravděpodobně obtížně pronikají do hlubších vrstev kořenových řezů, což je výraznější v případě podélných řezů, neboť kořenové buňky jsou protáhlé podle podélné osy, a tak je v případě příčných řezů větší pravděpodobnost absence příčných buněčných stěn a otevření

cesty pro vstup chemikálií do buněk. Jako použitelnější z hlediska penetrability se jeví TUNEL-TMR, neboť zde není takový rozdíl mezi zastoupením TUNEL-pozitivních jader v příčných a podélných řezech.

Není zřejmé, čím je dáno rozdílné chování složek TUNEL-TMR a TUNEL-AP směsi, neboť molekuly použité pro primární značení nukleotidů, tedy TMR a FITC, mají obdobnou molekulovou hmotnost (389,2 a 443,5) i chemické vlastnosti, jako např. schopnost vazby na primární aminy při pH 7 – 9 (Anonymous 2009). Hypoteticky by skutečnost, že FITC podléhá vazbě na specifické protilátky, mohla vysvětlovat to, že jím značené nukleotidy uvíznou někde na své cestě k jádru. Není však pravděpodobné, že by vinu za to nesly konkrétně protilátky dodávané v posledním kroku, kdy se z "AP-fluo" stává varianta "AP", neboť zastoupení TUNEL-pozitivních jader se pro obě tyto varianty neliší, a to na příčných ani podélných řezech (obr. 4.7). I v literatuře je možno najít informace o tom, že směsi na TUNEL reakci používající vazbu protilátek na fluorescein mohou mít potíže s pronikáním, dokonce i do živočišného materiálu (Labat-Moleur et al. 1998;Dubska et al. 2002). Bylo pozorováno, že se nukleotidy značené fluoresceinem od firmy Roche váží na amyloplasty (Kladnik 2007). Vzhledem k tomu, že v buňkách kořene kukuřice se plastidy vyskytují, mohou i ony v nějaké míře bránit pronikání nukleotidů k jádru. Prostupování složek TUNEL-reakce do buněk a k jádrům je pravděpodobně komplikací jen v případě silnějších řezů (žiletka, ruční mikrotom), neboť v případě použití mikrotomových řezů vzorků zalitých do parafinu jsou pravděpodobně všechny buňky prořezány (např. použití FITC u Gunawardena et al. (2001), kde však může být rizikovou kyselá fixace).

TUNEL reakce byla po léta, především u živočišného materiálu, používána jako jeden z klasických důkazů pro přítomnost PCD, ačkoli bylo opakovaně prokázáno, že k dvouvláknovým zlomům DNA může docházet i v jiných případech (Dong et al. 1997;Kelly et al. 2003;Taatjes et al. 2008;Anonymous 2006). Tento jev může provázet nekrotické změny v živočišných buňkách nebo může být též artefaktem zaviněným působením chemikálií používaných při přípravě materiálu (kyselé fixáže typu FAA nebo Carnoy používané některými autory, (Gunawardena et al. 2005) nebo dokonce mechanicky během mikrotomového řezání.

Z uvedených důvodů nelze TUNEL reakci považovat za zcela spolehlivou pro detekci znaků typických pro PCD a její použití je vhodné doplnit o aplikaci dalších metod. Klasikou je např. DNA-elektroforéza, díky níž je možné sledovat tvorbu typických apoptotických žebříčků způsobených internukleosomálním štěpením DNA buňky podléhající programované buněčné smrti, využití vazby annexinu V na fosfatidyl-serin, uplatňující se v časných fázích PCD, kdy

se odehrávají změny na plazmatické membráně, stále hojně užívaná je také elektronová mikroskopie schopná odhalit ultrastrukturní změny typické pro uvedený proces, kterými jsou např. kondenzace chromatinu a cytoplazmy, tvorba apoptotických tělísek apod., i když i zde panují neshody v tom, zda a které jevy jsou pro PCD výlučnými znaky (Van Doorn et al. 2011;Labat-Moleur et al. 1998;Ohno et al. 1998;Wyllie et al. 1998;Kanoh et al. 1999;Ito et al. 2006;Schwarz et al. 2006;Taatjes et al. 2008).

V poslední době je i v rostlinné biologii stále více kladen důraz na molekulárně biologické metody, avšak ještě nedávno byla snad nejběžněji používanou metodou právě TUNEL reakce (Gunawardena et al. 2001;Gunawardena et al. 2004;Gunawardena et al. 2005;Shishkova and Dubrovsky 2005;Chen et al. 2006;Xiong et al. 2006;Liu et al. 2007;Lombardi et al. 2007).

Tato metodika není v některých případech ani opřena o výsledky jiných procedur, ať už proto, že tyto výsledky byly neuspokojivé, jako v případě apoptotických žebříčků obtížně získatelných z heterogenního rostlinného materiálu (Xiong et al. 2006;Liu et al. 2007;Lombardi et al. 2007), nebo i proto, že jiné metody zapojeny nebyly (Shishkova and Dubrovsky 2005;Chen et al. 2006). V takových případech pak není možné s jistotou tvrdit, že se jedná skutečně o změny spojené s PCD.

**Lze tedy shrnout, že pro TUNEL reakci je třeba pro daný rostlinný materiál nalézt optimální ředění enzymatické směsi (v našem případě dvacetinásobné) a mít na paměti, že u ručních řezů je relevantní pouze výsledek pozorování povrchových vrstev, a to jak pro případ TUNEL-TMR, tak především pro TUNEL-AP, jehož penetrabilita je nižší, ale výhodou je zde možnost pozorovat TUNEL-pozitivní jádra bez rizika započítání jader s autofluorescencí. I v případě, že se vezme v potaz uvedené doporučení, je třeba posuzovat TUNEL reakci s jistou dávkou nedůvěry a pro důkaz PCD použít i metody další (Taatjes et al. 2008;Xie et al. 2008), z nichž však mnohé jsou pro rostlinný materiál nevhodné. Kromě metod molekulárních lze jako nejspolehlivější, s přihlédnutím k vlastnostem konkrétního materiálu, doporučit TEM a sledování apoptotických žebříčků pomocí DNA elektroforézy (Gunawardena et al. 2005;Xiong et al. 2006;Liu et al. 2007;Lombardi et al. 2007;Lenochova et al. 2009).**

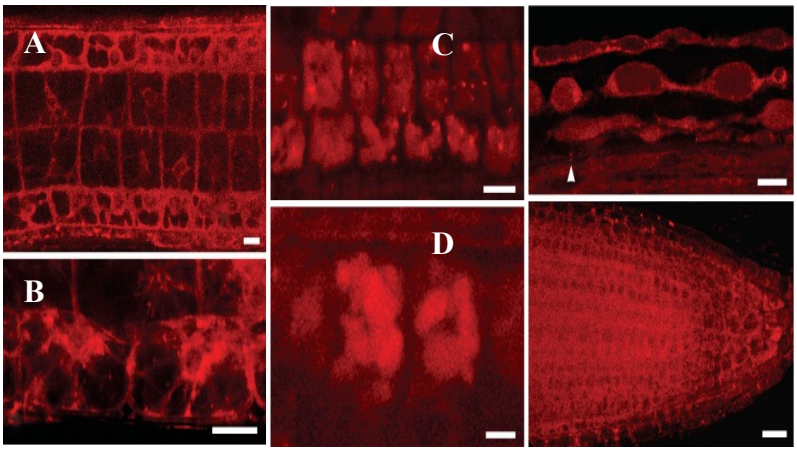
### 5.3 Viabilita kortikálních buněk:

Pro zachycení nástupu změn provázejících na buněčné úrovni vznik aerenchymatických kanálů byly kromě uvedených metod (TUNEL, TEM) aplikovány i postupy standardně používané pro studium buněčné viability. Patří mezi ně např. barvení nativních řezů pomocí neutrální červeně (NR) a Evansovy modři (EB) v kombinaci s jejich mikroskopickým pozorováním ve světlém poli (Kawai et al. 1998). NR se dočervena barví pouze při nízkém pH, což jsou podmínky, které v rostlinné buňce zavládnou po porušení celistvosti tonoplastu, ve chvíli, kdy přestane vakuola fungovat jako organela udržující $H^+$-iontovou homeostázu v buňce, nebo kdy se její kyselý obsah včetně hydrolytických enzymů vylije do cytoplazmy, což oboje patří k projevům spojeným s programovaným i neřízeným odumíráním buňky.

**Ukázalo se však, že pro použití na pokročile diferencovaných kukuřičných primárních kořenech je tato metoda poměrně nevhodná hned z několika důvodů. Jednak nebylo možné jednoznačně odlišit zbarvení NR od antokyanového zbarvení vakuol v buňkách povrchovějších kortikálních vrstev** (obr. 4.24, pravděpodobně i 11. vrstva v obr. 4.19)**, jednak byla intenzita zbarvení v různých buňkách odlišná a rozmístění takto obarvených buněk bylo značně nepravidelné.**

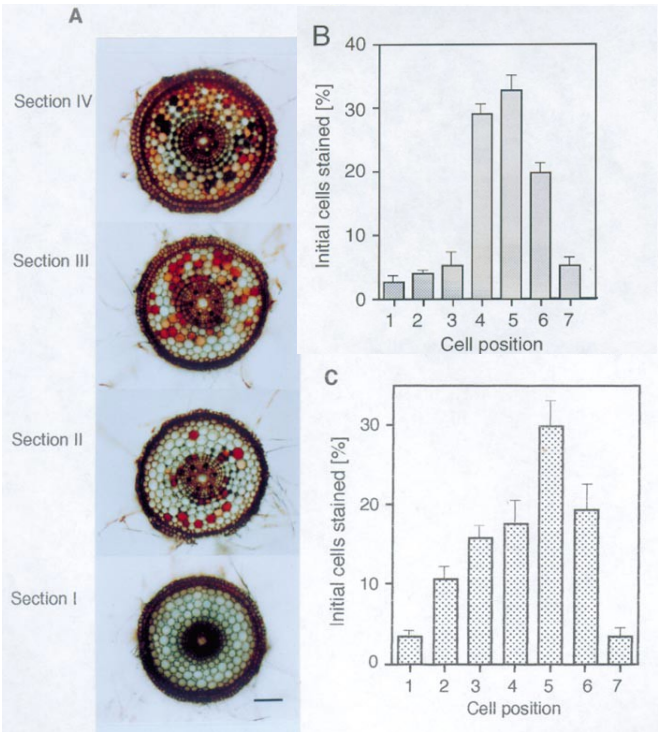
Nenabitá NR je lipofilní a bez problémů proniká přes plazmalemu i tonoplast, až do chvíle, než se setká s $H^+$ ionty, díky reakci s nimiž je pak uvězněna za membránou. NR v rostlinných buňkách běžně barví vakuoly, obdobně jako v živočišných buňkách lyzosomy. Bylo dokonce zjištěno, že pokud se NR používá jako fluorescenční barvička, záleží její lokalizace v buňce na použitém pufru a přesném složení barvicí směsi, obr. 5.6 (Dubrovsky et al. 2006). Vezmeme-li v potaz uvedené skutečnosti, není u buněk s velkou centrální vakuolou možné jendoznačně určit, zda je obarvena vakuola, nebo cytoplazma smíchaná s buněčnou šťávou. Pozorovaný rozdíl v intenzitě zbarvení by snad bylo možné vysvětlit jako reakci na různé pH (vakuola vs. okyselená cytoplazma).

**O buňkách, které prostřednictvím NR obarvené nejsou, lze tedy tvrdit, že jejich cytoplazma má neutrální pH, jedině v případě, že se jedná o buňky velmi málo vakuolizované nebo o buňky s vakuolami málo kyselými** (což v diskusi týkající se experimentů s kořeny rýže naznačuje (Kawai et al. 1998)). U diferencovaných pletiv je ale pravděpodobnější příčinou jejich bezbarvého vzhledu fakt, že byly jejich membránové struktury prořezány a i nabitá NR z nich mohla uniknout.

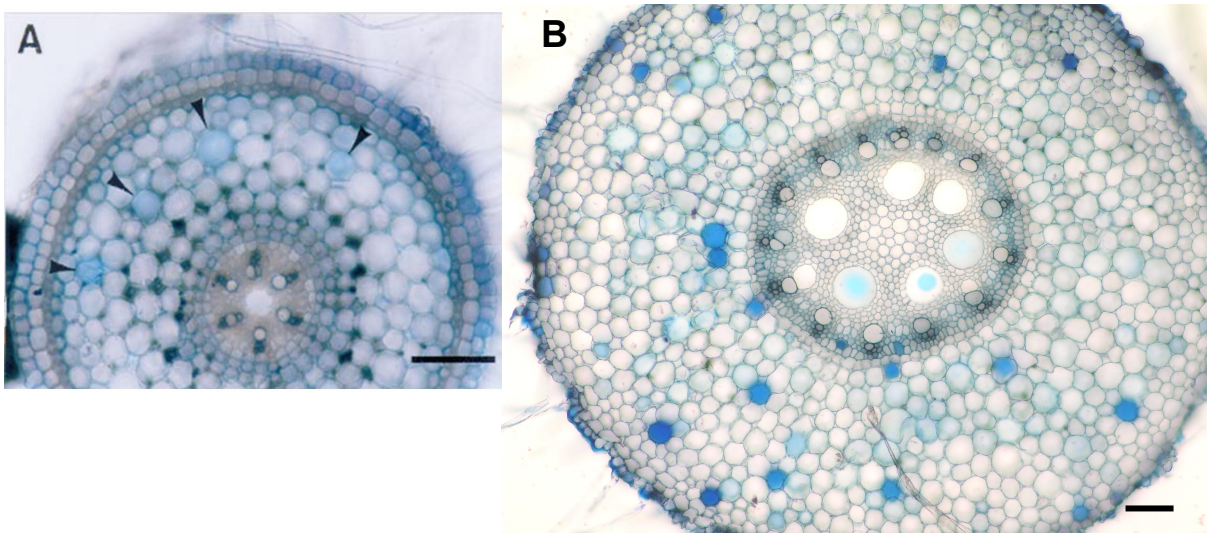



*Obr. 5.6. Využití NR jako flurochromu při konfokální mikroskopii – kořen Arabidopsis thaliana. NR v různých pufrech barví buď cytoplazmu (A,B) nebo vakuoly (C,D). Úsečka: A, B = 20 μm; C = 10 μm; D = 5. (Dubrovsky et al. 2006).*

Evansova modř (EB) je zbarvená do modra bez ohledu na okolní pH, ale přes intaktní plazmatickou membránu do buňky nepronikne. Buňky, které po obarvení a promytí pletiva zůstávají modré, jsou tedy buňky s plazmatickou membránou postrádající schopnost bránit vstupu některých látek, ale zároveň natolik celistvou, aby alespoň dočasně barvivo v buňce zadržela. Nekonzistentní nebo obtížně interpretovatelné výsledky uvedené v této práci mohou být tedy zapříčiněny buď obtížně proveditelným vymytím barviva z buněk, kam pronikla jen v důsledku mechanického porušení daného např. přípravou řezů (obr. 4.23), nebo naopak prořezáním a odbarvením i těch buněk, které by v neporušeném stavu obarvené byly. Z důvodu uvedených komplikací spojených s barvením pomocí EB a především NR je nesnadné interpretovat výsledky kvantitativního vyjádření toho, ve kterých vrstvách primární kůry jsou přednostně zastoupeny buňky, v nichž se podle uvedených barvení odehrávají fyziologické změny. K vyjasnění nikterak nepřispívá ani výrazně chaotičtější uspořádání primární kůry u kukuřice ve srovnání s rýží, u níž byla posloupnost odumírání buněk studována úspěšně (Kawai et al. 1998), obr. 5.7, 5.8.




*Obr. 5.7. Barvení seminálních kořenů rýže pomocí NR (A), zastoupení obarvených buněk v jednotlivých vrstvách primární kůry z oblasti II (blíže ke kořenové špičce, C) a zastoupení buněk obarvených EB v jednotlivých vrstvách primární kůry z oblasti III (dále od kořenové špičky, B). Úsečka = 100 μm, (Kawai et al. 1998).*



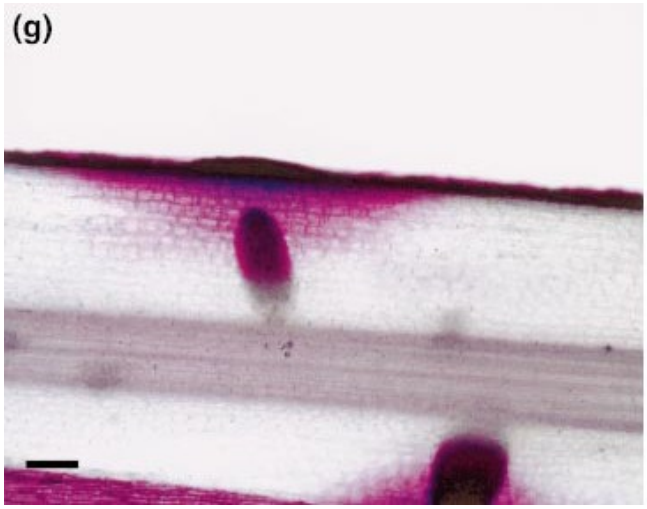

*Obr. 5.8. Srovnání anatomické stavby příčných řezů kořenem rýže (A, (Kawai et al. 1998)) a kukuřice (B, fotogradie Z. L.), oboje barveno pomocí EB (v případě A označeny EB-pozitivní buňky šipkami), úsečka = 100 μm.*

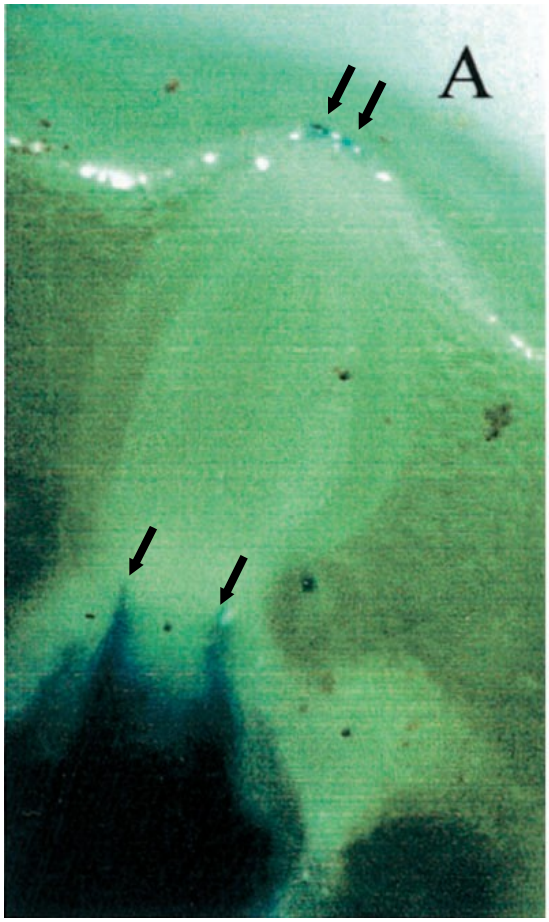
---

**Z hlediska anatomických pozorování lze však přesto říci, že jsou buňky obarvené EB umístěny především v některých konkrétních pozicích. Přednostně je najdeme v blízkosti již vytvořených aerenchymatických kanálů, v oblastech přilehlých k prorážejícím kořenům nebo přímo v těchto nově vznikajících primordiích** (obr. 4.20,

4.21, 4.22). V prvním a druhém uvedeném případě lze snad hovořit o souvislosti s umíráním buněk v daných oblastech. Odumírání kortikálních buněk obklopujících prorážející kořenové primordium bylo popsáno např. v kořenech sóji (pozitivní TUNEL reakce), (Kosslak et al. 1997).

V případě obarvených buněk primordií jde pravděpodobně spíše o proniknutí barviva z vodivých pletiv hlavního kořene do vodivých pletiv a mladých buněk základu laterálního kořene (obr. 4.21, D). Transport látek z cévních svazků do okolních pletiv může být v dosud neprorazivším primordiu umožněn funkčním symplastickým propojením, jaké bylo popsáno např. při tvorbě laterálních kořenů u *A. thaliana* prostřednictvím karboxyfluoresceinu (Oparka et al. 1995). Obdobné pronikání různých barviv do buněk mladého laterálního kořene bylo pozorováno u různých druhů mokřadních rostlin nebo u kukuřice, ač v uvedených případech se jednalo o transport barviv směrem od povrchu kořene ke střednímu válci, od kořene postranního ke kořeni hlavnímu (obr. 5.9), (Soukup et al. 2002;Mccully and Mallett 1993).




*Obr. 5.9. Podélný řez nodálním kořenem Phragmites australis penetrovaným 0,1% $HIO_4$, úsečka = 200 μm, (Soukup et al. 2002).*

*Obr. 5.10. Příčný řez stonkovým nodem Oryza sativa ošetřeným Evansovou modří (Mergemann 2000). Šipky označují obarvené epidermální buňky a barvivo pronikající ze stonkových vodivých pletiv do primordia.*

Mergemann a Sauter (2000) sledovali rovněž umírání buněk v pletivu přiléhajícím k prorážejícímu kořenovému primordiu, avšak v jejich případě šlo o tvorbu adventivních kořenů u rýže pěstované v zaplavení. Ve stonkových nodech těchto rostlin se pomocí EB barvily pouze pokožkové buňky (obr. 5.10), což autoři vysvětlují tím, že právě pokožka je část rostliny, která je nejčastěji vystavena působení nehostinných vnějších podmínek, mechanickému poškození a patogenům. Jako taková hraje významnou roli při spouštění ochranných mechanismů, které jsou však pro rostlinu energeticky náročné. Aby obdobně nereagovala i na poškození způsobené prorážejícím primordiem, mohou být její buňky předem odstraněny pomocí PCD (Mergemann 2000). Vysvětlením toho, proč se jako umírající nejeví také hlubší stonkové vrstvy však může být i to, že autoři nejprve barvili delší úseky stonků a teprve po obarvení je řezali, čímž se sice vyhnuli problémům s falešně pozitivními výsledky u prořezaných buněk, ale pravděpodobně zabránili i tomu, aby barvivo do hlubších vrstev vůbec proniklo.

Studium signálních kaskád ukázalo, že smrt epidermálních buněk kryjících prorážející primordium adventivního kořene je indukována peroxidem vodíku, etylénem a trimerním G-proteinem (Steffens and Sauter 2009). Skutečnost, že pokožkové buňky „uvolňují cestu" prorážejícím nodálním kořenům, lze nahlížet jako paralelu s pozorováním postranních kořenů např. u *Phragmites australis*, kde se v místě, kudy primordium prorazí na povrch nodálního kořene, vyskytují jakási „okénka" v hypodermálních vrstvách. Buněčné stěny podpokožkových buněk tu narozdíl od ostatních buněk stejné vrstvy nejsou suberinizované a lignifikované (Soukup et al. 2002).

Mutant kukuřice lrt1 je charakterizován neschopností tvořit na kterýchkoli hlavních kořenech kořeny laterální. Studiem rozdílů ve složení proteinů mezi přirozenou variantou a mutantem bylo zjištěno, že v kořeni lrt1 je několik bílkovin přítomno v několikanásobně vyšších koncentracích. Identifikováno bylo osm z uvedených proteinů, přičemž čtyři z nich jsou enzymy podílející se na metabolismu ligninu. Autoři studie (Hochholdinger et al. 2004) podtrhují skutečnost, že neschopnost rostliny tvořit postranní kořeny se díky změně komunikace mezi neúspěšně se vyvíjejícím laterálním kořenem a kořenem hlavním může podepsat na změně genetické exprese a proteinové skladby hlavního kořene. Vzhledem

k tomu, o členy jaké metabolické dráhy se v uvedeném případě jedná, je však možné uvažovat i o úloze chybějících ligninových „okének“ v hlavním kořeni, v místě, kudy by měl na povrch prorazit kořen vedlejší. Bylo prokázáno, že uvedený mutant primordia laterálních kořenů zakládá, ale jejich chaotické anatomické uspořádání jim pravděpodobně brání v úspěšném růstu. Tento mutant se chová odlišně za různých kultivačních podmínek (např. při různé dostupnosti kyslíku v rhizosféře) a od přirozeného genotypu liší např. méně pravidelnou tvorbou Caspariho proužků v exodermis, ukládáním ligninu v primární kůře a modifikacemi pericyklu (Husakova and Soukup 2011).

Z důvodu výše popsaných komplikací při práci s většími segmenty rostlinných pletiv a orgánů je barvení pomocí EB pravděpodobně využitelnější u buněčných kultur, jako v případě Hiraga et al. (2010), kde byl pozorován nástup PCD u buněk BY-2 v nepromíchávaném médiu. Tyto změny byly dokumentovány pomocí EB, TUNEL reakce, DNA elektroforézy a pozorování kondenzace chromatinu světelné mikroskopie.

Pro další studium odumírání kortikálních buněk a jejich lokalizace byly u kukuřice i typických mokřadních rostlin (viz dále) využity fluorescenční metody obecně řazené k technikám zaměřeným na zjišťování buněčné viability. Pro tyto účely existuje celá řada postupů založených na změně prostupnosti plazmatické membrány (ethidium bromid, propidium iodid, TOTO, SYTOX), pH v buňce (fluorescein diacetát a látky od něj odvozené, akridinová oranž), stavu nukleových kyselin (akridinová oranž), aktivitě esteráz (opět fluorescein diacetát a látky od něj odvozené) či na změnách asymetrie plazmatické membrány, specifických pro programovanou buněčnou smrt (annexin V, pro rostlinný materiál využívaný především na protoplastech (Ning et al. 2002;Lei et al. 2003). Některé z uvedených fluorochromů se vyrábějí v modifikacích s různými absorpčními a emisními spektry, díky čemuž je možné použít pro jeden vzorek více z nich, většinou spolu s kontrastním barvivem značícím buňky živé nebo všechny (SYTO, DAPI, Hoechst), (Johnson et al. 2010).

Pro výzkum změn kortikálních buněk kukuřice byla zvolena kombinace propidium iodidu (PI), oranžově zbarveného po vazbě na nukleové kyseliny v buňce s porušenou plazmalemou, a fluorescein diacetátu (FDA) dokazujícího přítomnost funkčních esteráz zeleným zbarvením, čímž se obvykle dokládá životaschopnost obarvených buněk. Jako doplňkové barvivo sloužilo zelené SYTO16, barvící jádra i v živých buňkách, a akridinová oranž (AO), detekující nízké pH a poškozenou DNA (Alvarez et al. 2011;Johnson et al. 2010). Přestože emisní spektra FDA a SYTO16 se v podstatě překrývají a jádra jsou patrná již díky FDA barvícímu vrstvu

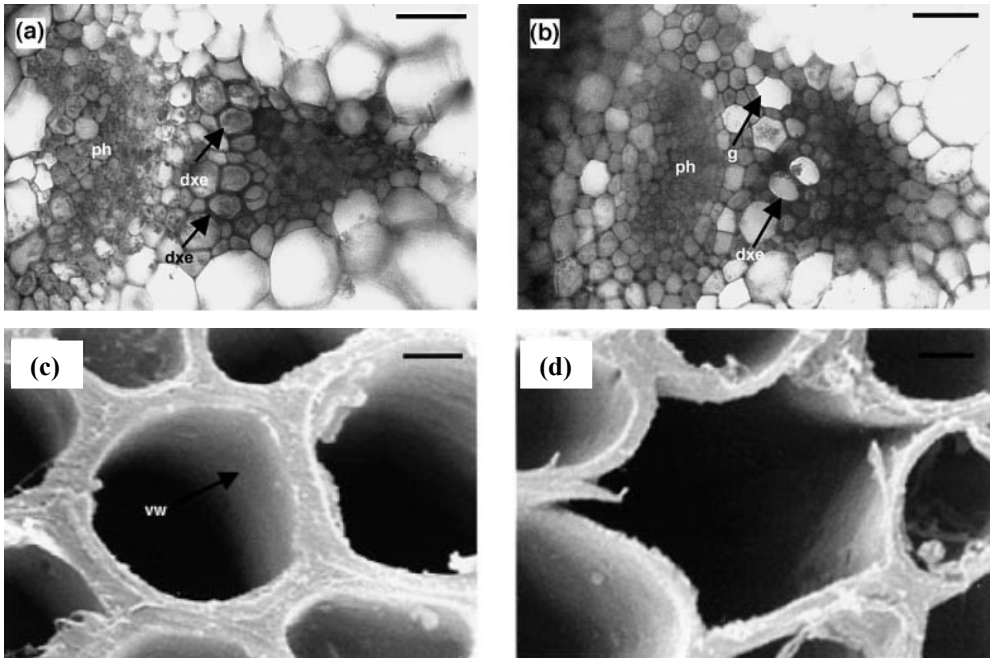
cytoplazmy, která je obklopuje, díky SYTO16 byla někdy jádra výraznější (cf. obr. 4.25 a 4.32).

Současné barvení pomocí PI a EB bylo aplikováno s cílem zjistit, zda jsou buňky obarvené EB mechanicky neporušené. Celistvost takových buněk měla být prokázána přítomností jáder, navíc obarvených PI díky změněnému charakteru membrány. Ukázalo se však, že jádra ani z evidentně prořezaných buněk nevypadávají(obr. 4.38, 4.39), a proto bylo od kombinace uvedených metod upuštěno. Při posuzování výsledků z barvení PI pak bylo třeba brát v úvahu pouze buňky neprořezané, což bylo možné spolehlivě rozpoznat pouze na podélných řezech.

Na těch bylo u kukuřice možné pozorovat jádra obarvená PI v blízkosti buněk, které se po obarvení FDA lišily od okolí. Zde je třeba uvést, že v buňkách, které byly živé, neporušené a pravděpodobně neprocházely žádnými fyziologickými změnami, FDA barvilo jen cytoplazmatické provazce, tenkou vrstvu nástěnné cytoplazmy a cytoplazmu v okolí jádra (obr. 4.26). Některé buňky, vyskytující se buď v oblasti primární kůry nebo ve středním válci, však obsahovaly drobné váčky obarvené FDA, mnohdy nahloučené kolem jádra (obr. 4.27, 4.28), případně výrazně fluoreskoval celý jejich protoplast, v některých případech ohraničující neobarvené kulovité objekty, jindy rozdělený do obarvených sférických útvarů (obr. 4.29). Lokalizace takto výrazně zbarvených buněk odpovídala rozmístění buněk obarvených EB (obr. 4.31). Některé buňky se jevily jako kompletně obarvené FDA a zároveň obsahující jádro označené PI, tedy jako takové, v nichž se ještě stále vyskytují aktivní esterázy, ačkoli byla porušena integrita plazmalemy (obr. 4.28, A). Silná fluorescence FDA však pravděpodobně dokáže částečně překrýt signál PI, navíc není na základě dvourozměrného pozorování možné vyloučit, že se každý z uvedených jevů nachází v jiné buňce. To se podařilo za použití konfokálního mikroskopu, díky němuž bylo potvrzeno, že se skutečně v jedné buňce zároveň nachází jak jádro obarvené PI (neporušené nebo fragmentované), tak protoplast emitující silnou fluorescenci FDA (obr. 4.30). Na základě uvedených pozorování, podobnosti vnitrobuněčných změn u buněk primární kůry a vodivých pletiv ve středním válci a některých údajů z literatury (viz dále) jsme posuzovali tyto získané výsledky jako analogii k PCD v průběhu vzniku tracheálních elementů.

Tuto paralelu mezi vznikajícími tracheálními elementy a lyzigenním aerenchymem dokládají (Kozela and Regan 2003) kromě shodného osudu dotyčných buněk v podobě PCD i dalšími společnými rysy – účastí vápenatých iontů a serinových proteáz v kaskádě předcházející samotné PCD či úplným odbouráním vnitřního obsahu buňky nutným pro správnou funkci každého z uvedených pletiv či existencí vodou vyplněných aerenchymatických struktur coby snadné cesty pro difúzi látek u některých vodních rostlin. Zdůrazňují též výraznou podobnost

mezi strukturou lyzigenního aerenchymu a xylému v mutantu *gpx* (*gapped xylem*) u *A. thaliana*, kde některé cévy vznikají z buněk k tomu určených, avšak neschopných správně ukládat sekundární buněčné stěny, obr. 5.11, (Turner and Hall 2000). Autoři na základě uvedených faktů uvažují o evoluční homologii lyzigenního aerenchymu a tracheálních elementů a docházejí k názoru, že se cévy dost možná vyvinuly z cest původně určených pro transport plynů v rostlinném těle (Kozela and Regan 2003).



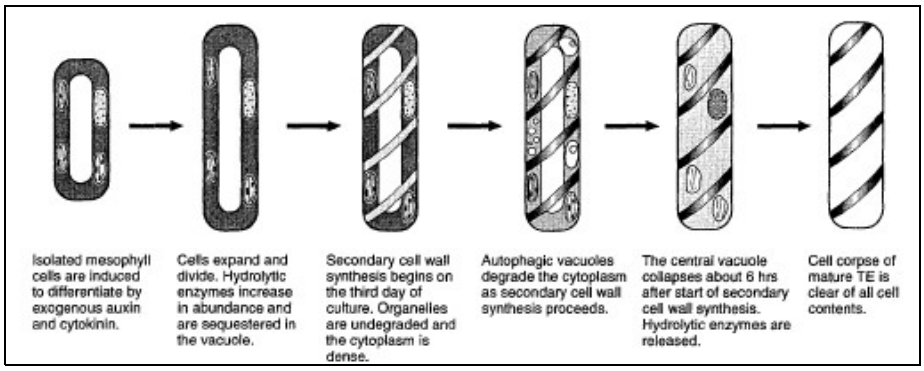

*Obr. 5.11. Snímky příčných řezů stonkem A. thaliana v divoké (a, c) a gpx formě. Cévy v rámci cévních svazků pozorované světelným mikroskopem (a, b; úsečka = 25 μm) a samostatně, pod skenovacím elektronovým mikroskopem (c, d; úsečka = 5 μm), dxe = rozvíjející se metaxylém, g = „mezera" po odbourané buňce, ph = floém, vw = buněčná stěna xylémového elementu. Spojení dvou obrázků z (Turner and Hall 2000).*

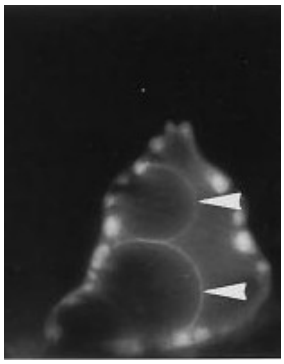
---

Rovněž přítomnost TUNEL-pozitivních jader a výsledky použití FDA a dalších metod u buněčné kultury *Zinnia elegans* indukované k tvorbě tracheálních elementů (TEs) uvedené závěry podporují.

Proces odumírání diferencujících se buněk této kultury byl popsán takto (viz obr. 5.12): Nejprve se buňka prodlužuje a mění svůj tvar, na to navazuje tvorba sekundární buněčné stěny, následovaná tvorbou drobných autofagických vakuol obsahujících části cytoplazmy a organely. V závěru dochází k porušení tonoplastu, kolapsu vakuoly (jejímu zmenšení), promíchání obsahu vakuoly s cytoplazmou a k postupnému rozkladu protoplastu. Pozorovány

byly též po několik hodin přežívající fragmenty protoplastů, vyloučené (zřejmě skrz primární políčka) do okolního prostředí z odumírajících buněk ještě před vytvořením sekundárních buněčných stěn (Groover et al. 1997). Centrální vakuola se během porušení tonoplastu může rovněž rozpadnout na několik vakuol menších, obr. 5.13 (Kuriyama 1999). Sekundární buněčná stěna, vytvořená ještě před vlastní smrtí protoplastu, se na jednom konci tracheálního elementu přeměňuje v perforační desku (Nakashima 2000).



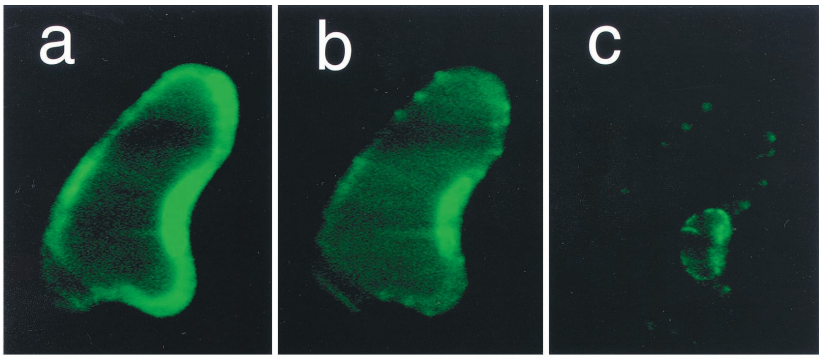



*Obr. 5.12. Navržená sekvence kroků v průběhu PCD při vzniku TEs v buněčné kultuře Z. elegans (Groover et al. 1997)*

*Obr. 5.13. TE z buněčné kultury Z.elegans obarvená membránovou fluorescenční barvičkou FM 4-64. Rozpad centrální vakuoly na vakuoly menší, (Kuriyama 1999).*

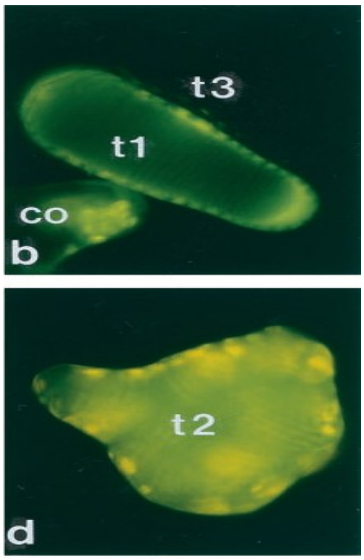
---

Aktivita esteráz vizualizovatelná prostřednictvím FDA je u vyvíjející se buňky vysoká v cytoplazmě, po prasknutí tonoplastu je po krátkou dobu fluorescenční celý protoplast. Jádro mění svůj tvar – nejprve je čočkovité, turgorem vakuoly přimáčknuté k buněčné stěně, po dezintegraci vakuoly se pak stává kulatějším a postupně ztrácí fluorescenci způsobenou SYTO16, obr. 5.14 (Obara et al. 2001).




*Obr. 5.14. TE obarvený FDA a SYTO16, těsně před porušením tonoplastu (a), vzápětí po něm (b) a poté, co polevil turgor a jádro změnilo svůj tvar (c), (Obara et al. 2001).*

Pokud je buňka vystavena působení FDA po dlouhou dobu, FDA zvolna difunduje do vakuoly, kde se jeho barva v důsledku nízkého pH posouvá od zelené ke žluté. Působí-li FDA na buňky po dobu kratší, mohou nastat dvě varianty – FDA je buď v cytoplazmě (u živé buňky, zelené zbarvení) nebo ve vakuole či v objemu celé buňky (po porušení integrity tonoplastu, žluté zbarvení), obr. 5.15, přičemž bylo zjištěno, že budoucí TEs se vyznačují vyšší schopností zadržovat FDA mimo vakuolu než buňky, které se v TEs nediferencují, (Kuriyama 1999).




*Obr. 5.15. Tracheální element s FDA v cytoplazmě (b) a v celém objemu buňky po porušení integrity tonoplastu (d), (Kuriyama 1999).*

Porušení tonoplastu a následné snížení pH cytoplazmy se zdá být obecnějším jevem v rostlinné PCD, čehož se využívá i v některých nových metodách – např. při vnášení genu pro tvorbu žlutého fluorescenčního proteinu (YFP), který v buňkách s nízkým pH ztrácí své fluorescenční vlastnosti. Experimentálně byla tato metoda ověřena jak na různých buněčných kulturách, tak i *in vivo* při xylogenezi v kořeni YFP-mutantní *A. thaliana* (Young et al. 2010). Nespecifické esterázy (enzymy schopné hydrolyticky štěpit esterové vazby) se účastní řady buněčných pochodů, jako je např. přestavování buněčné stěny, interakce mezi rostlinou a patogenem, metabolismus mastných kyselin atd. Jejich aktivita může být považována za marker diferenciace a prodlužování buněk, případně proces doprovázející stresové reakce, což bylo popsáno např. v pupenech smrku ztepilého v důsledku antropogenního znečištění okolního prostředí (Bilkova et al. 1999).

Stejně tak u vyvíjejících se vodivých pletiv lze identifikovat řadu esteráz a dalších hydrolytických enzymů. V průběhu syntézy sekundární buněčné stěny se ve vakuole hromadí hydrolázy, do signalizace vedoucí ke spuštění PCD jsou zapojeny G-proteiny a $Ca^{2+}$ (Groover and Jones 1999).V centrální vakuole i v autofagických vakuolách ve vyvíjejícím se

metaxylému a floému je přítomna aspartátová proteáza fytepsin (Runeberg-Roos and Saarma 1998). Pro přestavbu buněčných stěn v TEs (především pro vznik perforací na jednom konci buněk z kultury *Z. elegans)* jsou syntetizovány polygalakturonázy (Nakashima 2000).
Různé lipofilní deriváty FDA aplikované na pokožkové buňky kořenů kukuřice jsou substrátem odlišných esteráz v různých částech buňky (cytoplazma, vakuola), míra jejich fluorescence (a tedy míra aktivity uvedených enzymů) se v závislosti na lokalizaci liší v kyselém (5,5) a neutrálním (7,4) pH. Esterázy schopné způsobit fluorescenci FDA nebo jeho derivátů se tedy i v tomto pletivu nacházejí jak v cytoplazmě, tak ve vakuole (Brauer et al. 1996).

Váčkovité útvary v některých kortikálních buňkách nacházejících se v pozicích potenciálního vzniku aerenchymu, zbarvené prostřednictvím FDA, by mohly být ekvivalentem organel známých z jiných pletiv a rostlin. Jako nejpravděpodobnější analogy se nabízejí tzv. ricinosomy, tj. deriváty endoplazmatického retikula z endospermu skočce (*Ricinus communis*) poseté ribosomy, srov. s váčky pokrytými ribosomy, obr. 2.9, F. Tyto organely jsou charakteristické mj. přítomností proenzymu, z nějž se v závěrečných fázích PCD buněk endospermu, po vylití do cytoplazmy, stává cysteinová endopeptidáza papainového typu s C-koncovou KDEL sekvencí, tedy enzym připomínající živočišné kaspázy (viz literární úvod), (Mollenhauer and Totten 1970). Podobné enzymy byly nalezeny např. v dělohách *Vicia sativa*, *Vigna sativa,* v luscích *Phaseolus vulgaris,* v semenících *Pisum sativum* a v různých orgánech *Arabidopsis thaliana.* Několik cysteinových proteáz bylo identifikováno i v tracheálních elementech (Gietl and Schmid 2001). Obdobná KDEL proteáza byla nalezena i v dělohách *Vigna mungo*, kde byla lokalizována v útvarech označovaných jako K-vesicles či jen KVs (Toyooka et al. 2000). Tyto váčky se pravděpodobně účastní autofagického odbourávání buněk ve zralých dělohách (Toyooka et al. 2001).
Není bez zajímavosti, že právě ve formujících se cévách a v parenchymatických buňkách s nimi sousedících se mění struktura endoplazmatického retikula – jeho cisterny se rozšiřují a zakulacují, na koncích se mohou i zužovat, čímž získávají vřetenovitý tvar (ESAU 1975). Uvedený tvar (který je však odlišný od tvaru váčků v námi pozorovaných kortikálních buňkách kukuřice a mokřadních rostlin) naznačuje příbuznost s tzv. „ER bodies“, tělísky pokrytými ribosomy nalezenými v pokožkových buňkách, dělohách a přízemních listech *A. thaliana*. Tato tělíska obsahují mj. beta-glukosidázu PYK10, která hraje roli jak v přestavbě a rozkladu buněčných stěn, tak např. i při tvorbě přírodních pesticidů, čímž je dána pravděpodobná úloha uvedených organel v ochraně rostliny před mechanickým poškozením

prostřednictvím okusu či parazitace, (Matsushima et al. 2003). Stejné útvary popisují v pokožkových buňkách huseníčku i (Hayashi et al. 2001). Všímají si však i toho, že pokud jsou tyto buňky stresovány (zde pomocí koncentrovaného solného roztoku), spojují se tato vřetenovitá tělíska přímo s vakuolami, do kterých jsou takto bez dalších úprav (je vynechána fáze modifikací v Golgiho aparátu) vnášeny proteázy.

Otázkou v procesu PCD zůstávají její závěrečné fáze jak u kortikálních buněk, tak u TEs. Je pravděpodobné, že ačkoli je značná část protoplastu odbourána v rámci membránou ohraničených útvarů, jejich části (jak bylo ostatně pozorováno u TEs, (Groover et al. 1997)), i samotné hydrolytické enzymy a další složky „degradační mašinerie" jsou uvolňovány do mezibuněčných prostorů. Jak je tedy možné, že okolní buňky zůstávají rozkladných procesů ušetřeny? (Endo et al. 2001) zjistitili, že v buněčné kultuře *Zinnia elegans* se z umírajících TEs uvolňuje jednak proteasom 26S, jednak ale také protein TED4, který aktivitu tohoto proteasomu inhibuje, čímž chrání okolní buňky před poškozením. Není vyloučeno, že obdobný mechanismus (uplatňující se pravděpodobně i v jiných pletivech, viz Literární úvod) se účastní i vzniku lyzigenního aerenchymu.

**Na základě experimentů založených na sledování viability kortikálních buněk lze shrnout, že buňky, u nichž se odehrávají fyziologické změny vedoucí k jejich smrti, nebo buňky již mrtvé, se nacházejí obvykle v okolí aerenchymatických kanálů nebo v místě, kde lze vznik lyzigenního aerenchymu očekávat, dále v pletivech přilehlých k prorážejícím kořenovým primordiím a v oblasti vodivých pletiv ve středním válci.**

**U mnoha z používaných metod (NR, EB, PI) je však třeba mít na paměti, že mohou dávat falešně pozitivní výsledky, především z důvodu mechanického poškození buněk na řezných plochách pozorovaných objektů, případně v důsledku přítomnosti objemné centrální vakuoly s nízkým pH (NR). Naopak pro jiné metody může být prořezání buněk příčinou falešně negativních výsledků, neboť indikační látka může být z buňky vymyta (FDA, EB).**

**Díky TEM, fluorescenčním metodám a podobnosti s procesy během vzniku TEs, popsanými v literatuře, byl navržen pravděpodobný sled dějů v průběhu PCD kortikálních buněk vedoucí ke vzniku lyzigenního aerenchymu takto:**

**V buňkách určených k autolýze se objevují kulovité váčky obsahující esterázy. Tyto váčky mohou být obdobou ricinosomů, esterázy mohou být cíleně transportovány např. k vakuole nebo k buněčným stěnám, kde jsou později využity pro degradační procesy. Následně je porušena integrita tonoplastu, centrální vakuola se smršťuje nebo rozpadá**

**na vakuoly menší. Cytoplazma se mísí s vakuolární štávou, snižuje se její pH. Nakonec je porušena i plazmatická membrána, která ztrácí svou selektivitu, celý protoplast kolabuje, tvoří se menší plazmalemou ohraničené váčky, v nichž se rozkládají fragmenty protoplastu s organelami včetně jádra. Jádro se, narozdíl od průběhu v TEs, může rozdělit na několik částí. V úplném závěru jsou rozloženy buněčné stěny, čímž se proces vzniku lyzigenního aerenchymu zásadně liší od tvorby cév a cévic. V této fázi (ale nejen v ní) se jejich PCD podobá spíše smrti buněk provázející vznik listových perforací u kalatky madagaskarské (Gunawardena et al. 2004).**

Jako zástupce typických mokřadních rostlin byly studovány rákos obecný, ostřice úzkolistá, rýže setá a voďanka žabí (všechny tvořící lyzigenní aerenchym) a puškvorec obecný jako rostlina s aerenchymem expanzigenním.

U těch rostlin, jejichž některé kortikální buňky jsou předurčeny k programovanému skonu, byla běžně pozorována fluorescence FDA v celém objemu těchto buněk (rákos, ostřice, rýže). Tyto buňky tvořily buď radiální (na příčných řezech) nebo longitudinální řady (na podélných řezech), případně se nacházely v blízkosti prorážejících primordií (rákos, ostřice), kde kolokalizovaly s buňkami obarvenými EB. U některých z uvedených rostlin se vyskytovaly navíc prostřednictvím FDA obarvené vakuoly (rýže - ve středním válci, primární kůře a po okrajích koleoptile) nebo menší váčky (rákos, voďanka).

Radiální a longitudinální uspořádání buněk, v nichž se odehrávají fyziologické změny projevující se intenzivní fluorescencí FDA, lze vysvětlit vznikem aerenchymatických kanálů. Koordinované umírání sousedních buněk podle takovéhoto schématu pravděpodobně souvisí s funkčním symplastickým propojením prostřednictvím plazmodezmů. Taková propojení, běžně studovaná za použití fluorescenčních barviv či proteinů, vymezují tzv. symplazmické domény (termín v současnosti upřednostňovaný před variantou „symplastické“), tedy pletiva se společným dalším osudem v rámci rostlinné ontogeneze (Kurczynska 2008). (Kozela and Regan 2003) poukazují na schopnost rostliny regulovat v rámci pletiva svá cytoplazmatická spojení, tedy schopnost tvořit sekundární plazmodezmy nebo naopak ty existující uzavírat a tím ovlivňovat šíření vývojových signálů. Předpokládají, že právě tato regulace je zásadní pro tvorbu lyzigenního aerenchymu. Aktéry, kteří prostupují skrz plazmodezmy a pravděpodobně nejvíce ovlivňují další buněčný vývoj, jsou transkripční faktory a siRNA. Zabránit v průchodu do sousední buňky jim může absence plazmodezmů, jejich ucpání kalózou nebo např. modifikace samotné transportované látky (Burch-Smith et al. 2011). Jiný pohled nabízejí (Van Doorn et al. 2003), kteří uvádějí, že před otevřením květů *Iris hollandica* se uzavírají

plazmodezmy v mezofylu i epidermis korunních lístků, což může být příčinou narušení integrity pletiva a metabolické destabilizace, která vede ke spuštění PCD v symplazmicky odříznutých pletivech.

V případě odumírání kořenových buněk se však jedná spíš o variantu funkčního symplazmického spojení. Radiální šíření fluorescenčního signálu dextranů o definované velikosti bylo pozorováno v kořeni rýže (Kawai et al. 1998;Samarajeewa et al. 1999), přítomnost plazmodezmů v tangenciálních stěnách (tedy v těch, jimiž k sobě přiléhají paprsčitě uspořádané buňky) byla dokumentována ve vznikajícím aerenchymu v kořeni rákosu (Vášková 2007), viz literární úvod, obr. 2.8.

To, že se buňky s obsahem vykazujícím silnou esterázovou aktivitu nacházejí v blízkosti prorážejících kořenových primordií, je v souladu s faktem diskutovaným v případě kukuřice. Někteří autoři si však naopak všímají faktu, že v kořenech s lyzigenním aerenchymem v pokročilém stádiu vývoje zůstávají živé nebo alespoň zachované právě buňky v okolí primordia, např. v případě rýže (Clark and Harris 1981), orobince (Seago et al. 1999a) nebo rákosu (Soukup et al. 2002). V případě rákosu se navíc naproti prorůstajícímu primordiu netvoří hypodermis, což svědčí o kompexnějších vztazích uvnitř kořene. I v kořenech pozorovaných v rámci předkládané práce byla primordia obklopena vrstvami zachovalého pletiva, o němž však nelze tvrdit, že je tvořeno živými buňkami. Je možné, že se jedná pouze o jakousi oporu ukazující prorůstajícímu laterálnímu kořeni směr (obr. 4.34 D).

Rovněž buňky jasně obarvené FDA pozorované v okrajových oblastech koleoptile rýže (obr. 3.43) mohou být buňkami podstupujícími degradační procesy, které byly popsány např. v práci (Kawai and Uchimiya 2000).

Jádra s navázaným PI byla jasně patrná v primární kůře a středním válci ostřice a rákosu, u nějž se navíc objevovaly váčky či celé protoplasty obarvené dočervena díky AO. Ačkoli akridinová oranž bývá často používána jako látka vážící se na poškozenou DNA, v mnoha případech je využívána též pro detekci kyselého pH (Blumwald and Poole 1986), mnohdy tedy jako látka hromadící se např. ve váčcích vakuolárního původu. Vakuolárnímu původu takovýchto barevných změn v kortikálních buňkách rákosu nasvědčuje i fakt, že tmavočervené zbarvení protoplastu bylo v některých případech doprovázeno přítomností kulatého, turgorem nedeformovaného jádra (srov. obr. 4.33 a 5.16). Četné váčky obdobného zbarvení byly pozorovány i v některých kortikálních buňkách puškvorce, tedy rostliny se schizogenním aerenchymem. Poměrně rovnoměrná distribuce takových buněk dává tušit, že se jedná o tzv. idioblasty, u puškvorce charakteristické obsahem výrazně aromatických látek. Ačkoli aerenchym v kořenech této rostliny vzniká bez účasti PCD, buněčná smrt

pravděpodobně provází právě vývoj idioblastů. Jako buňky podléhající procesu PCD zahrnujícímu kondenzaci a následnou degradaci protoplastu jsou popisovány např. idioblasty v listech vavřínu (Evert and Esau 2006), str. 475 – 476. V práci autorů Soukup et al. (2005) jsou zachyceny podobné buňky, které se barví Evansovou modří, ale tyto „short cells“ se nacházejí v hypodermálních kořenových vrstvách.

Voďanka žabí je popisována jako rostlina, jejíž kořeny jsou na příčném průřezu uspořádány vysoce pravidelně. Díky tomuto charakteru jejich primární kůry je možné identifikovat pouze na základě pozice ty buňky, které mají následně podstoupit PCD (Seago et al. 1999b). V uvedených buňkách však žádná z našich mikroskopických metod testujících buněčnou viabilitu nepřinesla očekávané výsledky, až na pozitivní TUNEL reakci, která však barvila menší kulovité útvary, především v buňkách nacházejících se blíže povrchu kořene. Tyto útvary kolokalizovaly s chloroplasty, detekovanými díky červené autofluorescenci. Příčinou těchto nestandardních výsledků může být tendence fluoresceinem značených nukleotidů přisedat na povrch plastidů, což již bylo pozorováno v případě amyloplastů (Kladnik 2007). Jistou souvislost je možné hledat i mezi naším pozorováním a vznikem listových perforací u kalatky madagaskarské, kde se během programované buněčné smrti kolem jádra shlukují chloroplasty (Wright et al. 2009).

**Z mikroskopických pozorování zaměřených na srovnání vzniku aerenchymu u kukuřice a typických mokřadních rostlin vyplývá, že průběh PCD v jejich kortikálních buňkách zahrnuje některé společné rysy. Patří mezi ně fragmentace jaderné DNA, tvorba váčků obsahujících aktivní esterázy a vyznačujících se nízkým pH, porušení tonoplastu, mísení cytoplazmy s buněčnou šťávou a změny permeability plazmatické membrány. Tyto změny se odehrávají v buňkách lokalizovaných v blízkosti prorážejících kořenových primordií, v idioblastech a v oblasti budoucích lyzigenně vznikajících aerenchymatických kanálů. Jejich uspořádání koreluje se symplastickým propojením popisovaným v literatuře.**

**SHRNUTÍ:**

- **Tvorba aerenchymu v kořenech kukuřice, vliv kultivaru a kultivačních podmínek:**

- Aerenchym se tvořil v kořenech všech sledovaných rostlin kukuřice seté, bez ohledu na kultivační podmínky a použitý kultivar. Třináct srovnávaných genotypů se lišilo jen jeho rozsahem a uspořádaností primární kůry.

- Závislost tvorby aerenchymu na působení endogenního etylénu bylo prokázáno působením 200 $\mu$ M AOA, inhibitoru syntézy etylénu, jenž vznik aerenchymu v podstatě zablokoval.

- Působení AOA snížilo i počet TUNEL-pozitivních jader, na základě čehož lze usuzovat na souvislost mezi syntézou etylénu, vnitrobuněčnými změnami charakteristickými pro PCD a vznikem aerenchymu.

- Vliv AOA byl menší u rostlin pěstovaných v zatemnění, které se vyznačovaly delšími kořeny i prýty a výrazně vyšší porozitou ve srovnání s rostlinami pěstovanými za normální fotoperiody, což bylo interpretováno jako důsledek zvýšené tvorby etylénu během temné periody nebo zvýšené citlivosti rostliny k jeho standardní hladině.

- Jako vhodný indikátor pro stádium tvorby aerenchymu se ukázala délka kořene spíše než jejich stáří, neboť plocha aerenchymu je délce kořene přímo úměrná.

- Byla identifikována oblast s nejvyšším počtem TUNEL-pozitivních jader (3. až 6. vrstva primární kůry), jejíž lokalizace je v souladu s lokalizací aerenchymatických kanálů. TUNEL-pozitivní jádra se vyskytovala v radiálně uspořádaných shlucích připomínajících strukturu aerenchymatických kanálů.

- **Optimalizace TUNEL reakce:**

- Enzymatické směsi pro TMR i AP variantu u nových šarží bylo nutno 20x ředit, čímž se eliminovaly falešně pozitivní výsledky. Jako relevantní byly posuzovány pouze výsledky pozorování svrchních vrstev ručních řezů, neboť použité chemikálie do hlubších vrstev pronikaly obtížně. Výhodou varianty AP byla z literatury neznámá možnost pozorování vzorků pod UV zářením, kdy fluorescence TUNEL-pozitivních jader (narozdíl od jader ostatních) byla překryta černým produktem reakce alkalické fosfatázy.

- **Viabilita kortikálních buněk:**

- Použití neutrální červeně (NR) jako indikátoru kyselého charakteru cytoplazmy je u pokročile diferencovaných pletiv kukuřičných primárních kořenů nevhodné. Není možné odlišit zbarvení NR od antokyanového zbarvení vakuol v buňkách povrchovějších kortikálních vrstev, barvivo navíc pravděpodobně proniká do vakuol s nízkým pH, zaujímajících převážnou část buňky.

- Barvení Evansovou modří (EB) je rovněž problematické - barvivo proniká i do buněk s membránami mechanicky poškozenými při přípravě řezů, ale je obtížné jej pak z takových buněk vymýt. Přesto byly pozorovány anatomické trendy – buňky obarvené EB se nacházely přednostně v blízkosti již vytvořených aerenchymatických kanálů, v oblastech přilehlých k prorážejícím kořenům nebo přímo v nově vznikajících primordiích.

- Pomocí FDA se v živých buňkách nevykazujících fyziologické změny barví cytoplazmatické provazce, nástěnná cytoplazma a cytoplazma obklopující jádro, zatímco v buňkách určených k degradaci je výrazná esterázová aktivita v membránou ohraničených váčcích či homogenně v celých protoplastech.

- Buňky s jádry obarvenými PI (tedy buňky s porušenou integritou plazmatické membrány) byly pozorovány v blízkosti buněk výrazně obarvených FDA. V některých buňkách byla pozorována zároveň vysoká esterázová aktivita v celém protoplastu a jádro obarvené PI.

***Shrnutí***

- Byla popsána podobnost mezi průběhem PCD při vzniku aerenchymu a při tvorbě TEs, pozorované vezikuly byly srovnány s ricinosomy.

- Na základě provedených pozorování a srovnání se staršími výsledky byl navržen sled kroků v průběhu PCD při vzniku lyzigenního aerenchymu:
    1. Tvorba kulovitých váčků obsahujících esterázy, jejich transport po buňce (např. k jádru, vakuole nebo k buněčným stěnám).
    2. Porušení integrity tonoplastu, centrální vakuola se smršťuje nebo rozpadá na vakuoly menší. Cytoplazma se mísí s vakuolární šťávou, snižuje se její pH.
    3. Porušení plazmatické membrány, protoplast kolabuje a tvoří se menší váčky ohraničené plazmalemou, v nichž se rozkládají fragmenty protoplastu s organelami včetně jádra.
    4. Rozklad buněčných stěn.

- **Pozorování kortikálních buněk a jejich změn v kořenech typických mokřadních rostlin:**

- V případě mokřadních rostlin s aerenchymem lyzigenním se charakter vnitrobuněčných změn podobal popsanému případu kukuřice, lokalizace byla v souladu s pozdějším uspořádáním aerenchymu a symplastickým propojením popisovaným v literatuře.

- známky degradace buněčného obsahu byly pozorovány i v případě puškvorce s expanzigenním typem aerenchymu, kde jsou umírajícími buňkami pravděpodobně idioblasty.

## SEZNAM PUBLIKACÍ:

Není-li uvedeno jinak, hlavní díl experimentální práce včetně sepsání základu článku byly vykonány autorkou disertační práce.

1. LENOCHOVÁ, Z. Programovaná buněčná smrt v kořenech kukuřice seté *Zea mays* L. v průběhu vývoje aerenchymu. 2004. Charles University, Prague.
   Ref Type: Diplomová práce
2. LENOCHOVÁ, Z., O. VOTRUBOVÁ, A. KUTHANOVÁ, A. SOUKUP AND D. BARTÁKOVÁ. Programmed cell death during hypoxia-induced aerenchyma formation in roots of maize. 2004. Bratislava. Abstracts of 10th Days of Plant Physiology.
   Ref Type: Conference Proceeding
3. VOTRUBOVÁ O., Z. LENOCHOVÁ AND Z. MAŠKOVÁ. Vliv hypoxie na strukturu kořene kukuřice.2004. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 56-59
   Ref Type: Book of abstracts
   *Pouze dílčí příspěvek k experimentálním datům*
4. LENOCHOVÁ Z., A. SOUKUP AND O. VOTRUBOVÁ. 2009. Aerenchyma formation in maize. Biologia plantarum 263-270.
5. VOTRUBOVÁ O., Z. MAŠKOVÁ AND Z. LENOCHOVÁ. Changes in growth and anatomy of maize roots following hypoxia. Připravuje se pro Plant, Soil and Environment.
   *Pouze dílčí příspěvek k experimentálním datům*
6. LENOCHOVÁ Z., A. KUTHANOVÁ, A. SOUKUP AND O. VOTRUBOVÁ. TUNEL reaction in plant tissue: Troubles and solutions. 2011 přijato do oponentského řízení v Biologia plantarum, zamítnuto.
7. LENOCHOVÁ Z., KUTHANOVÁ A. AND VOTRUBOVÁ O. Sebevražda v zájmu celku. Programovaná buněčná smrt (nejen) u rostlin. 2004. Živa, 194-197
8. LENOCHOVÁ Z. Role plazmodezmů ve společenství rostlinných buněk. 2008. Živa. 103-105.

## POUŽITÁ LITERATURA:


1. AGUILAR, E. A., D. W. TURNER, AND K. SIVASITHAMPARAM. 1999. Aerenchyma formation in roots of four banana (*Musa spp.*) cultivars. Scientia horticulare 80: 57-72.

2. AKIMA, T. www.histonet.org . 2005.
Ref Type: Internet Communication

3. ALEKSANDRUSHKINA, N. I. AND B. F. VANYUSHIN. 2009. Endonucleases and their involvement in plant apoptosis. Russian Journal of Plant Physiology 56: 291-305.

4. ALVAREZ, M., A. VILLANUEVA, P. ACEDO, M. CANETE, AND J. C. STOCKERT. 2011. Cell death causes relocalization of photosensitizing fluorescent probes. Acta Histochemica 113: 363-368.

5. ANONYMOUS. TUNEL AP. [11 772 457 001]. 2005. 68298 Mannheim, Germany, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science.
Ref Type: Catalog

6. ANONYMOUS. *In Situ* Cell Death
Detection Kit, TMR red. 2006. Mannheim, Germany, Roche Applied Science.
Ref Type: Catalog

7. ANONYMOUS. Thermo Scientific Pierce Fluorescent Products Guide. second[1601803]. 2009. U.S., Thermo Fisher Scientific Inc.
Ref Type: Catalog

8. ARSHAD, M. AND W. T. FRANKENBERGER. 1988. Influence of Ethylene Produced by Soil-Microorganisms on Etiolated Pea-Seedlings. Applied and Environmental Microbiology 54: 2728-2732.

9. BALK, J. AND CH. J. LEAVER. 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. The Plant Cell 13: 1803-1818.

10. BECKER, R., A. RITTER, U. EICHHORN, J. LIPS, B. BERTRAM, M. WIESSLER, M. Z. ZDZIENICKA, AND B. KAINA. 2002. Induction of DNA breaks and apoptosis in crosslink-hypersensitive V79 cells by the cytostatic drug beta-D-glucosyl-ifosfamide mustard. British Journal of Cancer 86: 130-135.

11. BEERS, E. P. 1997. Programmed cell death during plant grouth and development. Cell Death and differentiation 4: 649-661.

12. BEERS, E. P. AND J. M. MCDOWELL. 2001. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. Current Opinion in Plant Biology 4: 561-567.

13. BILKOVA, J., J. ALBRECHTOVA, AND J. OPATRNA. 1999. Histochemical detection and image analysis of non-specific esterase activity and the amount of polyphenols during annual bud development in Norway spruce. Journal of Experimental Botany 50: 1129-1138.

14. BLEECKER, A. B. AND H. KENDE. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology 16: 1-+.

15. BLOUNT, M. www.histonet.org . 2005.
Ref Type: Internet Communication

16. BLUMWALD, E. AND R. J. POOLE. 1986. Kinetics of Ca2+/H+ Antiport in Isolated Tonoplast Vesicles from Storage Tissue of Beta-Vulgaris l. Plant Physiology 80: 727-731.

17. BONNEAU, L., Y. GE, G. E. DRURY, AND P. GALLOIS. 2008. What happened to plant caspases? Journal of Experimental Botany 59: 491-499.

18. BORTNER, C. D., B. E. N. OLDENBURG, AND J. A. CIDLOWSKI. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. Trends in Cell Biology 5: 21-26.

19. BOURANIS, D. L., S. N. CHORIANOPOULOU, V. F. SIYIANNIS, V. E. PROTONOTARIOS, AND M. J. HAWKESFORD. 2003. Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation. Planta 217: 382-391.

20. BOURANIS, D. L., S. N. CHORIANOPOULOU, C. KOLLIAS, P. MANIOU, V. E. PROTONOTARIOS, V. F. SIYIANNIS, AND HAWKESFORD M.J. 2006. Dynamics of Aerenchyma Distribution in the Cortex of Sulfate-deprived Adventitious Roots of Maize. Annals of Botany 97: 695-704.

21. BRAILSFORD, R. W., L. A. C. J. VOESENEK, C. W. P. M. BLOM, A. R. SMITH, M. A. HALL, AND M. B. JACKSON. 1993. Enhanced Ethylene Production by Primary Roots of Zea-Mays l in Response to Sub-Ambient Partial Pressures of Oxygen. Plant Cell and Environment 16: 1071-1080.

22. BRAUER, D., J. UKNALIS, R. TRIANA, AND S. I. TU. 1996. Subcellular compartmentation of different lipophilic fluorescein derivatives in maize root epidermal cells. Protoplasma 192: 70-79.

23. BUCKNER, B., D. JANICK-BUCKNER, J. GRAY, AND G. S. JOHAL. 1998. Cell-death mechanisms in maize. Trends in Plant Science 3: 218-223.

24. BURCH-SMITH, T. M., S. STONEBLOOM, M. XU, AND P. C. ZAMBRYSKI. 2011. Plasmodesmata during development: re-examination of the importance of primary, secondary, and branched plasmodesmata structure versus function. Protoplasma 248: 61-74.

25. BURSCH, W., A. ELLINGER, CH. GERNER, U. FROHWEIN, AND R. SCHHULTE-HERMANN. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? Zakeri, Z., Lockshin, R. A., and Martinez-A., C. Annals of the New York Academy of Sciences 926, 1-12. 2000. New Yourk, The New Yourk Academy

of Sciences.
Ref Type: Conference Proceeding

26. CAMPBELL, R. AND M. C. DREW. 1983. Electron-Microscopy of Gas Space (Aerenchyma) Formation in Adventitious Roots of Zea-Mays-l Subjected to Oxygen Shortage. Planta 157: 350-357.

27. CHALOUPKA, J. 1999. Adaptace a programovaná smrt – dvě odpovědi buňky na poškození. Jejich vzájemný vztah a význam pro přežití buněčných populací a organismů za stresových podmínek. Biologické listy 64: 81-102.

28. CHE, F.-S. I. M. T. N. T. S. M. E. S. N. K. I. I. 1999. Biochemical and Morfological Features of Rice Cell Death Induced by Pseudomonas avenae. Plant Cell and Physiology.

29. CHEN, J. X., D. E. HALL, J. MURATA, AND V. DE LUCA. 2006. L-alanine induces programmed cell death in V. labrusca cell suspension cultures. Plant Science 171: 734-744.

30. CHICHIRICCO, G. 2000. Ripening and dehiscence of the anther in some *Crocus* (Iridaceae) species. Caryologia 53: 255-260.

31. CHIPUK, J. E. AND D. R. GREEN. 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? Nature Reviews Molecular Cell Biology 6: 268-275.

32. CLARK, L. H. AND W. H. HARRIS. 1981. Observations on the Root Anatomy of Rice (Oryza sativa L.). American journal of botany 68: 154-161.

33. COHEN, J. J. 1993. Apoptosis. Immunology today 14: 126-130.

34. COLMER, T. D., M. C. H. COX, AND L. A. C. J. VOESENEK. 2006. Root aeration in rice (Oryza sativa): evaluation of oxygen, carbon dioxide, and ethylene as possible regulators of root acclimatizations. New Phytologist 170: 767-777.

35. COLMER, T. D. AND L. A. C. J. VOESENEK. 2009. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. Functional Plant Biology 36: 665-681.

36. COURTOIS, C., A. BESSON, J. DAHAN, S. BOURQUE, G. DOBROWOLSKA, A. PUGIN, AND D. WENDEHENNE. 2008. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca2+ and protein kinases. Journal of Experimental Botany 59: 155-163.

37. DANGL, J. L., R. A. DIETRICH, AND H. THOMAS 2000. Senescence and Programmed Cell Death. In B. Buchanan, Gruissem W., and R. L. Jones [eds.], Biochemistry and Molecular Biology of Plants 1044-1100. American Society of Plant Fysiologists, Rockwille, Maryland.

38. DANON, A., V. DELORME, N. MAILHAC, AND P. GALLOIS. 2000. Plant programmed cell death: A common way to die. Plant Physiology and Biochemistry 38: 647-655.

39. DE JONG A.J., HOEBERICHTS F.A., YAKIMOVA E.T., MAXIMOVA E., AND WOLTERING E.J. 2000. Chemical-induced Apoptotic Cell Death i Tomato Cells: Involvement of Caspase-like Proteases. Planta 211: 656-662.

40. DE SOUZA, T. C., E. M. DE CASTRO, F. J. PEREIRA, S. N. PARENTONI, AND P. C. MAGALHAES. 2009. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (Zea mays L.). Plant Soil and Environment 55: 504-510.

41. DEL POZO, O. AND E. LAM. 1998. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive
response of plants to pathogens. Current Biology 8: 1129-1132.

42. DETMAR, J. www.histonet.org . 2006.
Ref Type: Internet Communication

43. DONG, Z., P. SAIKUMAR, J. M. WEINBERG, AND M. A. VENKATACHALAM. 1997. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death - Involvement of serine but not cysteine proteases. American Journal of Pathology 151: 1205-1213.

44. DREW, M. C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol. 48: 223-250.

45. DREW, M. C., C. J. HE, AND P. W. MORGAN. 1989. Decreased Ethylene Biosynthesis, and Induction of Aerenchyma, by Nitrogen-Starvation Or Phosphate-Starvation in Adventitious Roots of Zea-Mays-l. Plant Physiology 91: 266-271.

46. DUBROVSKY, J. G., M. GUTTENBERGER, A. SARALEGUI, S. NAPSUCIALY-MENDIVIL, B. VOIGT, F. BALUSKA, AND D. MENZEL. 2006. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. Annals of Botany 97: 1127-1138.

47. DUBSKA, L., E. MATALOVA, AND I. MISEK. 2002. Detection of apoptosis in paraffin embedded tissues: the influence of tissue type and fixation. Acta Veterinaria Brno 71: 529-533.

49. DUNN, G. A. 1921. Note on the Histology of Grain Roots. American journal of botany 8: 207-211.

50. D´ABUNDO, D. M. Effects of submergence ons hypoxia on the growth and anatomy of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. 2003. Lousiana State University and Agricultural and Mechanical College, Department of Plant Biology.
Ref Type: Thesis/Dissertation

51. ECKER, J. R. 1995. The Ethylene Signal-Transduction Pathway in Plants. Science 268: 667-675.

52. EDWARDS, R. E. www.histonet.org . 2005.
Ref Type: Internet Communication

53. ELLIOTT, A. AND A. H. L. A. GUNAWARDENA. 2010. Calcium inhibition halts developmental programmed cell death in the lace plant, Aponogeton madagascariensis? Botany-Botanique 88: 206-210.

54. ENDO, S., T. DEMURA, AND H. FUKUDA. 2001. Inhibition of Proteasome Activity by the TED4 Protein inExtracellular Space: a Novel Mechanism for Protection of Living Cells fromInjury Caused by DyingCells. Plant and Cell Physiology 42: 9-19.

55. ENSTONE, D. E. AND C. A. PETERSON. 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. Plant Cell and Environment 28: 444-455.

56. ESAU, K. A. T. H. 1975. Dilated Endoplasmic Reticulum Cisternae in Differentiating Xylem of Minor Veins of Mimosa pudica L. Leaf. Annals of Botany 39: 167-174.

57. EVAN, G. I., L. BROWN, M. WHYTE, AND E. HARRINGTON. 1995. Apoptosis and the cell cycle. Current Opinion in Cell Biology 7: 825-834.

58. EVANS, D. E. 2004. Aerenchyma formation. New Phytologist 161: 35-49.

59. EVERT, R. F. AND K. ESAU 2006. Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development. Wiley-Interscience.

60. FATH, A., P. C. BETHKE, AND R. L. JONES. 1999. Barley aleurone cell death is not apoptotic: Characterization of nuclease activities and DNA degradation. Plant Journal 20: 305-315.

61. FENG, H. Q., Y. F. WANG, H. Y. LI, R. F. WANG, K. SUN, AND L. Y. JIA. 2010. Salt stress-induced expression of rice AOX1a is mediated through an accumulation of hydrogen peroxide. Biologia 65: 868-873.

62. FILONOVA, L. H., P. V. BOZHKOV, V. B. BRUKHIN, G. DANIEL, B. ZHIVOTOVSKY, AND S. VON ARNOLD. 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, norway spruce. Journal of cell science 113: 4399-4411.

63. FINLAYSON, S. A., H. L. GOHIL, H. KATO-NOGUCHI, I. J. LEE, AND P. W. MORGAN. 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.

64. FINLAYSON, S. A., I. J. LEE, AND P. W. MORGAN. 1998. Phytochrome B and the regulation of circadian ethylene production in sorghum. Plant Physiology 116: 17-25.

65. FOJTOVA, M. AND A. KOVARIK. 2000. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. Plant, Cell and Environment 23: 531-537.

66. GAVRIELI, Y., Y. SHERMAN, AND S. A. BENSASSON. 1992. Identification of Programmed Cell-Death Insitu Via Specific Labeling of Nuclear-Dna Fragmentation. Journal of Cell Biology 119: 493-501.

67. GEISLER-LEE, J., C. CALDWELL, AND D. R. GALLIE. 2010. Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. Journal of Experimental Botany 61: 857-871.

68. GIETL, C. AND M. SCHMID. 2001. Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. Naturwissenschaften 88: 49-58.

69. GIULIANI, C., G. CONSONNI, G. GAVAZZI, M. COLOMBO, AND S. DOLFINI. 2002. Programmed cell death during embryogenesis in maize. Ann Bot 90: 287-292.

70. GONZALES, M. www.histonet.org . 2005.
Ref Type: Internet Communication

71. GREENBERG, J. T. 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. PNAS 93: 12094-12097.

72. GREENWOOD, J. S., M. HELM, AND C. GIETL. 2005. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during Ricinus seed development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 2238-2243.

73. GROOVER, A., N. DEWITT, A. HEIDEL, AND A. JONES. 1997. Programmed cell death of plant tracheary elements: Differentiating in vitro. Protoplasma 196: 197-211.

74. GROOVER, A. AND A. M. JONES. 1999. Tracheary Element Differentiation Uses a Novel Mechanism Coordinating Programmed Cell Death and Secondary Cell Wall Synthesis. Plant Physiol. 119: 375-384.

75. GRUTTER, M. G. 2000. Caspases: key players in programmed cell death. Current Opinion in Structural Biology 10: 649-655.

76. GUNAWARDENA, A. H. L. A. AND N. G. DENGLER. 2006. Alternative modes of leaf dissection in monocotyledons. Botanical Journal of the Linnean Society 150: 25-44.

77. GUNAWARDENA, A. H. L. A., J. S. GREENWOOD, AND N. G. DENGLER. 2007. Cell wall degradation and modification during programmed cell death in lace plant, Aponogeton madagascariensis (Aponogetonaceae). American journal of botany 94: 1116-1128.

78. GUNAWARDENA, A. H. L. A., K. SAULT, P. DONNELLY, J. S. GREENWOOD, AND N. G. DENGLER. 2005. Programmed cell death and leaf morphogenesis in Monstera obliqua (Araceae). Planta 221: 607-618.

79. GUNAWARDENA, A. H. L. A. N., EVANS D.E., HAWES C.R., JACKSON M.B, AND PEARCE D.M. 2001a. Characterisation of PCD during Aerenchyma formation Induced by Ethylene or Hypoxia in Roots of Maize. Planta 212: 205-214.

80. GUNAWARDENA, A. H. L. A. N., J. S. GREENWOOD, AND N. G. DENGLER. 2004. Programmed Cell Death Remodels Lace Plant Leaf Shape during Development. The Plant Cell 16: 60-73.

81. GUNAWARDENA, A. H. L. A. N., D. M. E. PEARCE, M. B. JACKSON, C. R. HAWES, AND D. E. EVANS. 2001b. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (Zea mays L.) promoted by ethylene. Plant Cell Environ 24: 1369-1375.

82. GUO, H. W. AND J. R. ECKER. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. Current Opinion in Plant Biology 7: 40-49.

83. GUPTA, S. D. 2007. Plasma membrane ultrastructure in embryogenic cultures of orchardgrass during NaCl stress. Biologia Plantarum 51: 759-763.

84. HATSUGAI, N. AND I. HARA-NISHIMURA. 2010. Two vacuole-mediated defense strategies in plants. Plant Signaling and Behavior 5.

85. HATSUGAI, N., M. KUROYANAGI, M. NISHIMURA, AND I. HARA-NISHIMURA. 2006. A cellular suicide strategy of plants: Vacuole-mediated cell death. Apoptosis 11: 905-911.

86. HATSUGAI, N., M. KUROYANAGI, K. YAMADA, T. MESHI, S. TSUDA, M. KONDO, M. NISHIMURA, AND I. HARA-NISHIMURA. 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates, virus-induced hypersensitive cell death. Science 305: 855-858.

87. HAVEL, L. D. D. J. 1996. Apoptosis in Plants. Bot.Acta 109.

88. HAYASHI, Y., K. YAMADA, T. SHIMADA, R. MATSUSHIMA, N. K. NISHIZAWA, M. NISHIMURA, AND I. HARA-NISHIMURA. 2001. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. Plant and Cell Physiology 42: 894-899.

89. HE, C. J., P. W. MORGAN, AND M. C. DREW. 1996a. 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 Physiol. 112: 463-472.

90. HE, CJ., S. A. FINLAYSON, M. C. DREW, W. R. JORDAN, AND P. W. MORGAN. 1996b. Ethylene Biosynthesis during Aerenchyma Formation in Roots of Maize Subjected to Mechanical Impedance and Hypoxia. Plant Physiol. 112: 1679-1685.

91. HENGARTNER, O. 2000. The Biochemistry of Apoptosis. Nature 407: 770-776.

92. HINZ, M., I. W. WILSON, J. YANG, K. BUERSTENBINDER, D. LLEWELLYN, E. S. DENNIS, M. SAUTER, AND R. DOLFERUS. 2010. Arabidopsis RAP2.2: An Ethylene Response Transcription Factor That Is Important for Hypoxia Survival. Plant Physiology 153: 757-772.

93. HIRAGA, A., T. KANETA, Y. SATO, AND S. SATO. 2010. Programmed cell death of tobacco BY-2 cells induced by still culture conditions is affected by the age of the culture under agitation. Cell Biology International 34: 189-196.

94. HLAVATÁ, Z. Vliv nedostatku kyslíku na kořenový systém kukuřice *Zea mays L.* 1992. Praha, Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin.
Ref Type: Report

95. HOCHHOLDINGER, F., L. GUO, AND P. S. SCHNABLE. 2004. Lateral roots affect the proteome of the primary root of maize (Zea mays L.). Plant Molecular Biology 56: 397-412.

96. HOEBERICHTS, F. A. AND E. J. WOLTERING. 2002. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay
of conserved cell death mechanisms
and plant-specific regulators. BioEssays 25: 47-57.

97. HUSAKOVA, E. AND A. SOUKUP. Root structure and development in rootless maize mutant lrt1. 2011. Slovakia. 7th International Symposium on Structure and Function of Roots. 2011.
Ref Type: Conference Proceeding

98. INADA, N. S. A. K. H. K. T. 1999. Senescence Program in Rice (Oryza sativa) leaves: Analysis of the Blade of the Second Leaf at the Tissue and Cellular Levels. Protoplasma 207: 222-232.

99. IRFAN, M., S. HAYAT, Q. HAYAT, S. AFROZ, AND A. AHMAD. 2010. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. Protoplasma 241: 3-17.

100. ITO, Y., M. A. SHIBATA, K. KUSAKABE, AND Y. OTSUKI. 2006. Method of specific detection of apoptosis using formamide-induced DNA denaturation assay. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 54: 683-692.

101. ITO-INABA, Y., Y. HIDA, AND T. INABA. 2009. What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. Planta 231: 121-130.

102. JACKSON, M. B. AND W. ARMSTRONG. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. Plant biology 1: 274-287.

103. JACKSON, M. B., T. M. FENNING, M. C. DREW, AND L. R. SAKER. 1985. Stimulation of Ethylene Production and Gas-Space (Aerenchyma) Formation in Adventitious Roots of Zea-Mays-l by Small Partial Pressures of Oxygen. Planta 165: 486-492.

104. JIANG, Z., X. F. SONG, Z. Q. ZHOU, L. K. WANG, J. W. LI, X. Y. DENG, AND H. Y. FAN. 2010. Aerenchyma formation: programmed cell death in adventitious roots of winter wheat (Triticum aestivum) under waterlogging. Functional Plant Biology 37: 748-755.

105. JOHNSON, I., T. LIFE, AND M. T. Z. SPENCE 2010. The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition. Life Technologies.

106. JONES, A. 2000. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? Trends in Plant Science 5: 225-230.

107. JONES, A. M., S. COIMBRA, A. FATH, M. SOTTOMAYOR, AND H. THOMAS 2001. Programmed cell death assays for plants.

108. JONES, M. A. AND J. L. DANGL. 1996. Logjam at te Styx: programmed cell death in plants. Trends in Plant Science 1: 114-119.

109. JUSTIN, S. H. AND W. ARMSTRONG. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. New Phytologist 106: 465-495.

110. JUSTIN, S. H. F. W. AND W. ARMSTRONG. 1991. Evidence for the Involvement of Ethene in Aerenchyma Formation in Adventitious Roots of Rice (Oryza-Sativa L). New Phytologist 118: 49-62.

111. KANOH, M., G. TAKEMURA, J. MISAO, Y. HAYAKAWA, T. AOYAMA, K. NISHIGAKI, T. NODA, T. FUJIWARA, K. FUKUDA, S. MINATOGUCHI, AND H. FUJIWARA. 1999. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy - Not apoptosis but DNA repair. Circulation 99: 2757-2764.

112. KAWAI, M., P. K. SAMARAJEEVA, R. A. BARRERO, M. NISHIGUCHI, AND H. UCHIMIYA. 1998. Cellular dissection of the degradation of cortical cell death during aerenchyma formation in rice roots. Planta 204: 277-287.

113. KAWAI, M. AND H. UCHIMIYA. 2000. Coleoptile Senescence in Rice (Oryza sativa L.). Ann Bot 86: 405-414.

114. KELLY, K. J., R. M. SANDOVAL, K. W. DUNN, B. A. MOLITORIS, AND P. C. DAGHER. 2003. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. American Journal of Physiology-Cell Physiology 284: C1309-C1318.

115. KERR, J. F. R., A. H. WYLLIE, AND A. R. CURRIE 1972. In C. D. Bortner, B. E. N. Oldenburg, and J. A. Cidlowski [eds.], The role of DNA fragmentation in apoptosis (1995), vol. 5, Trends in cell biology.

116. KLADNIK, A. www.histonet.org . 2007.
Ref Type: Internet Communication

117. KORTHOUT, H. A. A. J., G. BERECKI, W. BRUIN, B. VAN DUIJN, AND M. WANG. 2000. The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. FEBS Letters 475: 139-144.

118. KOSSLAK, R. M., M. A. CHAMBERLIN, R. G. PALMER, AND B. A. BOWEN. 1997. Programmed cell death in the root cortex of soybean root necrosis mutants. Plant Journal 11: 729-745.

119. KOSTA, A., C. ROISIN-BOUFFAY, M. F. LUCIANI, G. P. OTTO, R. H. KESSIN, AND P. GOLSTEIN. 2004. Autophagy gene disruption reveals a non-vacuolar cell death pathway in Dictyostelium. Journal of Biological Chemistry 279: 48404-48409.

120. KOTULA, L., K. RANATHUNGE, AND E. STEUDLE. 2009. Apoplastic barriers effectively block oxygen permeability across outer cell layers of rice roots under deoxygenated conditions: roles of apoplastic pores and of respiration. New Phytologist 184: 909-917.

121. KOUKALOVA, B., A. KOVARIK, J. FAJKUS, AND J. SIROKY. 1997. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. FEBS Letters 414: 289-292.

122. KOZELA, C. AND S. REGAN. 2003a. How plants make tubes. Trends in Plant Science 8: 159-164.

124. KUO-HUANG, L. L., S. H. CHEN, AND S. J. CHEN. 2000. Ultrastructural study on the formation of sclereids in the floating leaves of Nymphoides coreana and Nuphar schimadai. Botanical Bulletin of Academia Sinica 41: 283-291.

125. KURCZYNSKA, E. U. 2008. Symplasmic communication: Terminology, fluorochromes and Arabidopsis thaliana embryogenesis. Postepy Biologii Komorki 35: 31-43.

126. KURIYAMA, H. 1999. Loss of Tonoplast Integrity in Tracheary Element Differentiation. Plant Physiology 121: 763-774.

127. KUTHANOVA, A., L. FISCHER, P. NICK, AND Z. OPATRNY. 2008a. Cell cycle phase-specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. Plant Cell and Environment 31: 1634-1643.

128. KUTHANOVA, A., L. GEMPERLOVA, S. ZELENKOVA, J. EDER, I. MACHACKOVA, Z. OPATRNY, AND M. CVIKROVA. 2004. Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. Plant Physiology and Biochemistry 42: 149-156.

129. KUTHANOVA, A., Z. OPATRNY, AND L. FISCHER. 2008b. Is internucleosomal DNA fragmentation an indicator of programmed death in plant cells? Journal of Experimental Botany 59: 2233-2240.

130. LABAT-MOLEUR, F., C. GUILLERMET, P. LORIMIER, C. ROBERT, S. LANTUEJOUL, E. BRAMBILLA, AND A. NEGOESCU. 1998. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: Critical evaluation and improvement. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 46: 327-334.

131. LACHAUD, C., D. DA SILVA, V. COTELLE, P. THULEAU, T. C. XIONG, A. JAUNEAU, C. BRIERE, A. GRAZIANA, Y. BELLEC, J. D. FAURE, R. RANJEVA, AND C. MAZARS. 2010. Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. Cell Calcium 47: 92-100.

132. LAM, E., D. PONTIER, AND O. DEL POZO. 1999. Die and let live - programmed cell death in plants. Current Opinion in Plant Biology 2: 502-507.

133. LEE, R.-H. AND S.-C. G. CHEN. 2002. Programmed cell death during rice leaf senescence is
nonapoptotic. New Phytologist 155: 25-32.

134. LEI, X. Y., X. D. LIAO, G. Y. ZHANG, AND Y. R. DAI. 2003. Flow cytometric evidence for hydroxyl radical-induced apoptosis in tobacco protoplasts. Acta botanica sinica 45: 944-948.

135. LENOCHOVÁ, Z. Programovaná buněčná smrt v kořenech kukuřice seté *Zea mays L.* v průběhu vývoje aerenchymu . 1-165. 2004. Department of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, CR.
Ref Type: Thesis/Dissertation

136. LENOCHOVÁ, Z., A. KUTHANOVÁ, AND O. VOTRUBOVÁ. 2004a. Sebevražda v zájmu celku aneb programovaná rostlinná smrt nejen u rostlin/Suicide in the Common Interest. Programmed Cell Death (not only) in Plants. Živa 194-197.

137. LENOCHOVA, Z., A. SOUKUP, AND O. VOTRUBOVA. 2009. Aerenchyma formation in maize. Biologia Plantarum 263-270.

138. LENOCHOVÁ, Z., O. VOTRUBOVÁ, A. KUTHANOVÁ, A. SOUKUP, AND D. BARTÁKOVÁ. Programmed cell death during hypoxia-induced aerenchyma formation in roots of maize. 8. 2004b. Bratislava. Abstracts of 10th Days of Plant Physiology.
Ref Type: Conference Proceeding

139. LHOTAK, S. www.histonet.org . 2005.
Ref Type: Internet Communication

140. LINDHOLM, P., T. KUITTINEN, O. SORRI, D. GUO, A. MERITS, K. TORMAKANGAS, AND P. RUNEBERG-ROOS. 2000. Glykosilation of phytepsin and expression of *dad1*, *dad2* and *ost1* during onset of cell death in germinating barley scutella. Mechanisms of Development 93: 169-173.

141. LIU, S. H., B. Y. FU, H. X. XU, L. H. ZHU, H. Q. ZHAI, AND Z. K. LI. 2007. Cell death in response to osmotic and salt stresses in two rice (Oryza sativa L.) ecotypes. Plant Science 172: 897-902.

142. LOMBARDI, L., N. CECCARELLI, P. PICCIARELLI, AND R. LORENZI. 2007. DNA degradation during programmed cell death in Phaseolus coccineus suspensor. Plant Physiology and Biochemistry 45: 221-227.

143. LONGSTRETH, D. J. AND O. N. BORKHSENIOUS. 2000. Root cell ultrastructure in developing aerenchyma tissue of three wetland species. Annals of Botany 86: 641-646.

144. MACHACKOVA, I., N. CHAUVAUX, W. DEWITTE, AND H. VANONCKELEN. 1997. Diurnal fluctuations in ethylene formation in Chenopodium rubrum. Plant Physiology 113: 981-985.

145. MALIK, A. I., T. D. COLMER, H. LAMBERS, AND M. SCHORTEMEYER. 2003. Aerenchyma formation and radial O-2 loss along adventitious roots of wheat with only the apical root portion exposed to O-2 deficiency. Plant Cell and Environment 26: 1713-1722.

146. MANO, Y., M. MURAKI, M. FUJIMORI, T. TAKAMIZO, AND B. KINDIGER. 2005. Identification of QTL controlling adventitious root formation during flooding conditions in teosinte (Zea mays ssp huehuetenangensis) seedlings. Euphytica 142: 33-42.

147. MANO, Y. AND F. OMORI. 2009. High-density linkage map around the root aerenchyma locus Qaer1.06 in the backcross populations of maize Mi29 x teosinte "Zea nicaraguensis". Breeding Science 59: 427-433.

148. MANO, Y., F. OMORI, T. TAKAMIZO, B. KINDIGER, R. M. BIRD, AND C. H. LOAISIGA. 2006. Variation for root aerenchyma formation in flooded and non-flooded maize and teosinte seedlings. Plant and Soil 281: 269-279.

149. MARICLE, B. R. AND R. W. LEE. 2002. Aerenchyma development and oxygen transport in the estuarine cordgrasses *Spartina alterniflora* and *S. anglica*. Aquatic botany 74: 109-120.

150. MATSUSHIMA, R., Y. HAYASHI, K. YAMADA, T. SHIMADA, M. NISHIMURA, AND I. HARA-NISHIMURA. 2003. The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology 44: 661-666.

151. MCCULLY, M. E. AND J. E. MALLETT. 1993. The Branch Roots of Zea-3, Vascular Connections and Bridges for Nutrient Recycling. Annals of Botany 71: 327-341.

152. MERGEMANN, H. AND M. SAUTER. 2000. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. Plant Physiology 124: 609-614.

153. MERGEMANN, H. S. M. 2000. Ethylene Induced Epidermal Cell Death at the Site of Adventitious Root Emergence in Rice. Plant Physiology 124: 609-614.

154. METRAUX, J. P. AND H. KENDE. 1983. The Role of Ethylene in the Growth-Response of Submerged Deep-Water Rice. Plant Physiology 72: 441-446.

155. MICHALCZUK, B. AND R. M. RUDNICKI. 1993. The Effect of Monochromatic Red-Light on Ethylene Production in Leaves of Impatiens-Balsamina l and Other Species. Plant Growth Regulation 13: 125-131.

156. MITTLER, R., L. SIMON, AND E. LAM. 1997. Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. Journal of cell science 110: 1333-1344.

157. MOLLENHAUER, H. H. AND C. TOTTEN 1970. Studies on seeds V. In C. Gietl and Schmid M [eds.], Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues (2001).

158. MORTIMER, J. C., A. LAOHAVISIT, N. MACPHERSON, A. WEBB, C. BROWNLEE, N. H. BATTEY, AND J. M. DAVIES. 2008. Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. Journal of Experimental Botany 59: 533-544.

159. MORTON, W. M., K. R. AYSCOUGH, AND P. J. MCLAUGHLIN. 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. Nature Cell Biology 2: 376-378.

160. NAKASHIMA, T. K. F. M. F. H. 2000. Autolysis during In Vitro Tracheary Element Differentiation: Formation and Location of the Perforation. Plant Cell Physiology 41: 1267-1271.

161. NING, S. B., Y. C. SONG, AND P. VAN DAMME. 2002. Characterization of the early stages of programmed cell death in maize root cells by using comet assay and the combination of cell electrophoresis with annexin binding. Electrophoresis 23: 2096-2102.

162. O'CONNOR, J. www.histonet.org . 2004.
Ref Type: Internet Communication

163. OBARA, K., H. KURIYAMA, AND H. FUKUDA. 2001. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in Zinnia. Plant Physiol. 125: 615-626.

164. OHNO, M., G. TAKEMURA, A. OHNO, J. MISAO, Y. HAYAKAWA, S. MINATOGUCHI, T. FUJIWARA, AND H. FUJIWARA. 1998. "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation - Analysis by immunogold electron microscopy combined with in situ nick end-labeling. Circulation 98: 1422-1430.

165. OPARKA, K. J., D. A. M. PRIOR, AND K. M. WRIGHT. 1995. Symplastic Communication Between Primary and Developing Lateral Roots of Arabidopsis-Thaliana. Journal of Experimental Botany 46: 187-197.

166. PAK, C. AND W. G. VAN DOORN. 2005. Delay of Iris flower senescence by protease inhibitors. New Phytologist 165: 473-480.

167. PAN, J.-W., M.-Y. ZHU, H.-Z. PENG, AND L.-L. WANG. 2002. Developmental regulation and biological functions of root border cells in higher plants. Acta botanica sinica 44: 1-8.

168. PAPINI, A., S. MOSTI, E. MILOCANI, G. TANI, P. DI FALCO, AND L. BRIGHIGNA. 2011. Megasporogenesis and programmed cell death in Tillandsia (Bromeliaceae). Protoplasma 248: 651-662.

169. PENG, H. P., C. S. CHAN, M. C. SHIH, AND S. F. YANG. 2001a. Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. Plant Physiology 126: 742-749.

170. PENG, H.-P., C.-S. CHAN, M.-C. SHIH, AND S. F. YANG. 2001b. Signaling Events in the Hypoxic Induction of Alcohol Dehydrogenase Gene in Arabidopsis. Plant Physiol. 126: 742-749.

171. PENNEL, R. I. AND C. LAMB. 1997. Programmed Cell Death in Plants. The Plant Cell 9: 1157-1168.

172. PETRUSSA, E., A. BERTOLINI, V. CASOLO, J. KRAJNAKOVA, F. MACRI, AND A. VIANELLO. 2009. Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of Abies alba. Planta 231: 93-107.

173. PONCE, G., P. W. BARLOW, L. J. FELDMAN, AND G. I. CASSAB. 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.

174. PROSKURYAKOV, S., A. KONOPLYANNIKOV, AND V. GABAI. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Experimental cell research 283: 1-16.

175. REAPE, T. J. AND P. F. MCCABE. 2008. Apoptotic-like programmed cell death in plants. New Phytologist 180: 13-26.

176. REAPE, T. J., E. M. MOLONY, AND P. F. MCCABE. 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. Journal of Experimental Botany 59: 435-444.

177. ROBERTS, K. AND M. C. MCCANN. 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. Current Opinion in Plant Biology 3: 517-522.

178. ROST, T. L. 1994. Root tip organization and spatial relationship of differentiation events . In M. Iqbal [ed.], Growth patterns in vascular plants 59-76. Dioscorides Press, Portland, OR, USA.

179. RUNEBERG-ROOS, P. AND M. SAARMA. 1998. Phytepsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. Plant Journal 15: 139-145.

180. RUZIN, S. E. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford New York.

181. SAMARAJEEWA, P. K., R. A. BARRERO, C. UMEDA-HARA, M. KAWAI, AND H. UCHIMIYA. 1999. Cortical cell death, cell proliferation, macromolecular movements and rTip1 expression pattern in roots of rice (Oryza sativa L,) under NaCl stress. Planta 207: 354-361.

182. SAMUILOV, V. D., E. M. LAGUNOVA, D. B. KISELEVSKY, E. V. DZYUBINSKAYA, Y. V. MAKAROVA, AND M. V. GUSEV. 2003. Participation of chloroplasts in plant apoptosis. Bioscience Reports 23: 103-117.

183. SCHMID, M., D. SIMPSON, AND C. GIETL. 1999. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 14159-14164.

184. SCHMID, M., D. J. SIMPSON, H. SARIOGLU, F. LOTTSPEICH, AND C. GIETL. 2001. The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 5353-5358.

185. SCHUSSLER, E. E. AND D. J. LONGSTRETH. 2000. Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in Sagittaria lancifolia (Alismataceae). American Journal of Botany 87: 12-19.

186. SCHWARZ, K., G. SIMONIS, X. J. YU, S. WIEDEMANN, AND R. H. STRASSER. 2006. Apoptosis at a distance: Remote activation of caspase-3 occurs early after myocardial infarction. Molecular and Cellular Biochemistry 281: 45-54.

187. SCHWARZEROVA, K., Z. VONDRAKOVA, L. FISCHER, P. BORIKOVA, E. BELLINVIA, K. ELIASOVA, L. HAVELKOVA, J. FISEROVA, M. VAGNER, AND Z. OPATRNY. 2010. The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. Bmc Plant Biology 10.

188. SEAGO, J. L., L. C. MARSH, K. J. STEVENS, A. SOUKUP, O. VOTRUBOVA, AND D. E. ENSTONE. 2005. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. Annals of Botany 96: 565-579.

189. SEAGO, J. L., C. A. PETERSON, D. E. ENSTONE, AND C. A. SCHOLEY. 1999a. Development of the endodermis and hypodermis of Typha glauca Godr. and Typha angustifolia L. roots. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique 77: 122-134.

190. SEAGO, J. L. JR., C. A. PETERSON, AND D. E. ENSTONE. 1999b. Cortical ontogeny in roots of the aquatic plant, *Hydrocharis morsus-ranae* L. Canadian journal of botany 77: 113-121.

191. SENATORE, A., C. P. TROBACHER, AND J. S. GREENWOOD. 2009. Ricinosomes Predict Programmed Cell Death Leading to Anther Dehiscence in Tomato. Plant Physiology 149: 775-790.

192. SHISHKOVA, S. AND J. G. DUBROVSKY. 2005. Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran Desert Cactaceae. American journal of botany 92: 1590-1594.

193. SINGH, A., K. B. EVANSEN, AND T. H. KAO 1992. Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Pettunia inflata*. In Y. Xu and M. R. Hanson [eds.], Programmed Cell Death during Pollination-Induced Petal Senescence in Petunia (2000), vol. 122, Plant physiology.

194. SMITH, B. A., M. L. REIDER, AND J. S. FLETCHER. 1982. Relationship Between Vital Staining and Subculture Growth During the Senescence of Plant-Tissue Cultures. Plant Physiology 70: 1228-1230.

195. SOUKUP, A., W. ARMSTRONG, L. SCHREIBER, R. FRANKE, AND O. VOTRUBOVA. 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.

196. SOUKUP, A., J. L. SEAGO, AND O. VOTRUBOVA. 2005. Developmental anatomy of the root cortex of the basal monocotyledon, Acorus calamus (Acorales, Acoraceae). Annals of Botany 96: 379-385.

197. SOUKUP, A., O. VOTRUBOVÁ, AND H. ČÍŽKOVÁ. 2002. Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. New Phytologist 153: 277-287.

198. STEFFENS, B. AND M. SAUTER. 2009. Heterotrimeric G Protein Signaling Is Required for Epidermal Cell Death in Rice. Plant Physiology 151: 732-740.

199. STEINBACHOVA-VOJTISKOVA, L., E. TYLOVA, A. SOUKUP, H. NOVICKA, O. VOTRUBOVA, H. LIPAVSKA, AND H. CIZKOVA. 2006. Influence of nutrient supply on growth, carbohydrate, and nitrogen metabolic relations in Typha angustifolia. Environmental and experimental botany 57: 246-257.

200. STEPANOVA, A. N. AND J. M. ALONSO. 2005. Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. Physiologia Plantarum 123: 195-206.

201. SUAREZ, M. F., L. H. FILONOVA, A. SMERTENKO, E. I. SAVENKOV, D. H. CLAPHAM, S. VON ARNOLD, B. ZHIVOTOVSKY, AND P. V. BOZHKOV. 2004. Matacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. Current Biology 14: 339-340 (Abstract).

202. TAATJES, D. J., B. E. SOBEL, AND R. C. BUDD. 2008. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. Histochemistry and Cell Biology 129: 33-43.

203. TAKATSUKA, C., Y. INOUE, K. MATSUOKA, AND Y. MORIYASU. 2004. 3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. Plant and Cell Physiology 45: 265-274.

204. TANG, X. AND W. R. WOODSON 1996. Temporal and spatial expresion of 1-amylocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature Petunia flowers. In Y. Xu and M. R. Hanson [eds.], Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in Petunia1 (2000), vol. 122, Plant physiology.

205. THOMAS, S. G. AND V. E. FRANKLIN-TONG. 2004. Self incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen . Nature 429: 305-309 (Abstract).

206. TOYOOKA, K., T. OKAMOTO, AND T. MINAMIKAWA. 2000. Mass transport of preform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. Journal of Cell Biology 148: 453-463.

207. TOYOOKA, K. 2001. Cotyledon cells of Vigna mungo seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. Journal of Cell Biology 154: 973-982.

208. TRILLAS, M. I., L. COTXARRERA, E. CASANOVA, AND N. CORTADELLAS. 2000. Ultrastructural changes and localisation of chitin and callose on compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fussarium oxysporum*. Physiological and molecular plant pathology 56: 107-116.

209. TROBACHER, C. P. 2009. Ethylene and programmed cell death in plants. Botany-Botanique 87: 757-769.

210. TURNER, S. R. AND M. HALL. 2000. The gapped xylem mutant identifies a common regulatory step in secondary cell wall deposition. Plant Journal 24: 477-488.

211. VAN BEL, A. J. E., K. EHLERS, AND M. KNOBLAUCH. 2002. Sieve elements caught in the act. Trends in Plant Science 7: 126-132.

212. VAN DOORN, W. G., P. A. BALK, A. M. VAN HOUWELINGEN, F. A. HOEBERICHTS, R. D. HALL, O. VORST, VAN DER SCHOOL, AND M. F. VAN WORDRAGEN. 2003. Gene expression during anthesis and senescence in Iris flowers. Plant Molecular Biology 53: 845-863.

213. VAN DOORN, W. G., E. P. BEERS, J. L. DANGL, V. E. FRANKLIN-TONG, P. GALLOIS, I. HARA-NISHIMURA, A. M. JONES, M. KAWAI-YAMADA, E. LAM, J. MUNDY, L. A. J. MUR, M. PETERSEN, A. SMERTENKO, M. TALIANSKY, F. VAN BREUSEGEM, T. WOLPERT, E. WOLTERING, B. ZHIVOTOVSKY, AND P. V. BOZHKOV. 2011. In press. Morphological classification of plant cell deaths. Cell Death and differentiation.

214. VAN DOORN, W. G., A. SINZ, AND M. M. TOMASSEN. 2004. Daffodil flowers delay senescence in cut Iris flowers. Phytochemistry 65: 571-577.

215. VAN ENGELAND, M., L. J. W. NIELAND, F. C. S. RAMAEKERS, B. SCHUTTE, AND C. P. M. REUTELINGSPERGER. 1998. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry 31: 1-9.

216. VANGRONSVELD, J., H. CLIJSTERS, AND M. VANPOUCKE. 1988. Phytochrome-Controlled Ethylene Biosynthesis of Intact Etiolated Bean Seedlings. Planta 174: 19-24.

217. VANYUSHIN, B. F., L. E. BAKEEVA, V. A. ZAMYATNINA, AND N. I. ALEKSANDRUSHKINA 2004. Apoptosis in plants: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO.

218. VÁŠKOVÁ, K. Symplastické propojení buněk v průběhu vývoje primární kůry kořene. 2007. Přírodovědecká fakulta UK, Katedra fyziologie rostlin.
Ref Type: Thesis/Dissertation

219. VISSER, E. J. W., T. D. COLMER, C. W. P. M. BLOM, AND L. A. C. J. VOESENEK. 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.

220. VOESENEK, L. A. C. J. AND C. W. P. M. BLOM. 1989. Growth-Responses of Rumex Species in Relation to Submergence and Ethylene. Plant Cell and Environment 12: 433-439.

221. VOTRUBOVÁ, O. AND A. PECHÁČKOVÁ. 1996. Effect of nitrogen over-supply on root structure of common reed. Folia geobotanica and phytotaxonomica 31: 119-125.

222. WANG, H., H.-M. WU, AND A. Y. CHEUNG. 1996. Pollination induced mRNA poly (A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. The plant journal 9: 715-727.

223. WANG, M., S. HOEKSTRA, S. VAN BERGEN, G. E. M. LAMERS, B. J. OPPEDIJK, M. W. VAN DER HEIJDEN, W. DE PRIESTER, AND R. A. SCHILPEROORT. 1999. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in Hordeum vulgare L. Plant Molecular Biology 39: 489-501.

224. WANG, M., B. J. OPPEDIJK, M. P. M. CASPERS, G. E. M. LAMERS, M. J. BOOT, D. N. G. GEERLINGS, B. BAKHUIZEN, A. H. MEIJER, AND B. VAN DUIJN. 1998. Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in the aleurone of germinating barley. Journal of Experimantal Botany 49: 1293-1301.

225. WANG, Y., J. S. LIN, AND G. X. WANG. 2010. Role of calcium in nitric oxide-induced programmed cell death in tobacco protoplasts. Biologia Plantarum 54: 471-476.

226. WATKIN, E. L. J., C. J. THOMSON, AND H. GREENWAY. 1998. Root Development and Aerenchyma Formation in Two Wheat Cultivars and One Triticale Cultivar Grown in Stagnant Agar and Aerated Nutrient Solution. Ann Bot 81: 349-354.

227. WENDEHENNE, D., A. PUGIN, D. F. KLESSIG, AND J. DURNER. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. Trends in Plant Science 6: 177-183.

228. WENDEHENNE, D., O. LAMOTTE, J.-M. FRACHISSE, H. BARBIER-BRYGOO, AND A. PUGIN. 2002. Nitrate Efflux Is an Essential Component of the Cryptogein Signaling Pathway Leading to Defense Responses and Hypersensitive Cell Death in Tobacco. Plant Cell 14: 1937-1951.

229. WHIBLEY, C., P. D. P. PHAROAH, AND M. HOLLSTEIN. 2009. p53 polymorphisms: Cancer implications. Nature Reviews Cancer 9: 95-107.

230. WIDLAK, P. 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. Acta biochimica Polonica 47: 1037-1044.

231. WIEDENROTH, E. M. 1993. Responses of Roots to Hypoxia - Their Structural and Energy Relations with the Whole Plant. Environmental and experimental botany 33: 41-51.

232. WIEDENROTH, E. M. AND B. ERDMANN. 1985. Morfological changes in wheat seedlings (Triticum aestivum L.) following root anearobiosis and partial pruning of the root system. Annals of Botany 56: 307-316.

233. WIKIPEDIA.ORG. 2012.
Ref Type: Audiovisual Material

234. WREDLE, U., B. WALLES, AND I. HAKMAN. 2001. DNA fragmentation and nuclear degradation during programmed cell deah in the suspensor and endosperm. Int.J.Plant Sci. 162: 1053-1063.

235. WRIGHT, H., W. G. VAN DOORN, AND A. H. L. A. GUNAWARDENA. 2009a. In Vivo Study of Developmental Programmed Cell Death Using the Lace Plant (Aponogeton Madagascariensis; Aponogetonaceae) Leaf Model System. American journal of botany 96: 865-876.

236. WRIGHT, H., W. G. VAN DOORN, AND A. H. L. A. GUNAWARDENA. 2009b. In Vivo Study of Developmental Programmed Cell Death Using the Lace Plant (Aponogeton Madagascariensis; Aponogetonaceae) Leaf Model System. American journal of botany 96: 865-876.

237. WYLLIE, A., V. DONAHUE, B. FISCHER, D. HILL, J. KEESEY, AND S. MANZOW. Apoptosis and cell proliferation. 2nd. 1998. Mannheim, Germany, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica.
Ref Type: Catalog

238. XIE, Q., I. LIU, S. YU, R. WANG, Z. FAN, Y. WANG, AND F. SHEN. 2008. Detection of DNA ladder during cotyledon senescence in cotton. Biologia Plantarum 52: 654-659.

239. XIONG, H. Y., Y. S. LI, AND L. J. LI. 2006. A unique form of cell death occurring in meristematic root tips of completely submerged maize seedlings. Plant Science 171: 624-631.

240. XU, H. AND M. C. HEATH. 1998. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. Plant Cell 10: 585-598.

241. XU, Y. AND M. R. HANSON. 2000. Programmed Cell Death during Pollination-Induced Petal Senescence in Petunia. Plant Physiology 122: 1323-1334.

242. YOUNG, B., R. WIGHTMAN, R. BLANVILLAIN, S. B. PURCEL, AND P. GALLOIS. 2010. pH-sensitivity of YFP provides an intracellular indicator of programmed cell death. Plant Methods 6.

243. ZHANG, H., S. DONG, M. WANG, W. WANG, W. SONG, X. DOU, X. ZHENG, AND Z. ZHANG. 2010. The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from Nicotiana benthamiana in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure. Journal of Experimental Botany 61: 3799-3812.

244. ZHANG, X. G., D. M. YIN, W. ZHU, C. Z. MA, AND T. D. FU. 2011. Progress on characterization of self-incompatibility in Brassica napus L. Euphytica 182: 147-155.

245. ZHU, J. M., K. M. BROWN, AND J. P. LYNCH. 2010. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (Zea mays L.). Plant Cell and Environment 33: 740-749.

246. ZHU, T. AND T. L. ROST. 2000. Directional cell-to -cell communication in the *Arabidopsis* root apical meristem III. Plasmodesmata turnover and apoptosis in meristem and root cap cells during four weeks after germination . Protoplasma 213: 99-107.