

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Anna Ungrová

Úloha chloroplastů ve středním válci kořenů epifytických orchidejí
The role of chloroplasts in the stele of epiphytic orchid roots

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jan Ponert, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Praha, 2021

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 dne 23.4.2021

Podpis

Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala zejména svému školiteli RNDr. Janu Ponertovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a veškerý čas, který mi věnoval. Také bych ráda poděkovala své konzultantce RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za cenné rady a pomoc při provádění experimentů i sepsování práce a dále celé své rodině za trpělivost po celou dobu zpracovávání.

Abstrakt

Fotosyntéza vzdušných kořenů epifytických orchidejí je předmětem řady studií. Kořeny jsou však vždy hodnoceny jako homogenní struktura, i když se ve skutečnosti skládají z výrazně odlišných oblastí. Tato práce se poprvé zabývá možností prostorového rozdělení fotosyntézy mezi vrstvami kořene, konkrétně primární kůrou a středním válcem. Byla využita kombinace různých mikroskopických technik, histochemická charakterizace apoplastických bariér a imunohistochemická lokalizace fotosyntetického enzymu PEP-karboxyláza. Z výsledků vyplývá, že dobře vyvinuté chloroplasty ve středním válci se v podčeledi *Epidendroideae* patrně vyskytují u všech epifytických zástupců, zatímco v podčeledi *Vanilloideae* se vyskytují příležitostně. Svou ultrastrukturou se systematicky liší od chloroplastů primární kůry, takže je pravděpodobné, že se liší také jejich funkce. Apoplastické bariéry jsou v kořenech výrazné a diferencují se brzy během vývoje kořene, což může chloroplasty ve středním válci efektivně izolovat od primární kůry. Chloroplasty se vyskytují také v silně sklerifikovaných buňkách středního válce, kde byly identifikovány dosud neznámé ztenčeniny buněčných stěn, které by mohly zajišťovat výměnu plynů uvnitř středního válce. Překvapivé je, že enzym PEP-karboxyláza je lokalizován do propustných buněk endodermis a jejich okolí, což ukazuje na další heterogenitu fotosyntetických funkcí chloroplastů v radiálním směru kořene.

Klíčová slova: vstavačovité, vzdušné kořeny, chloroplasty, ultrastruktura, fotosyntéza

Abstract:

The photosynthesis of the aerial roots of epiphytic orchids has been the subject of numerous studies. However, the roots are always evaluated as a homogeneous structure, even though they actually consist of significantly different areas. This work deals for the first time with the possibility of the spatial distribution of photosynthesis between the root layers, specifically the cortex and the stele. A combination of various microscopic techniques, the histochemical characterization of the apoplastic barriers and the immunohistochemical localization of the photosynthetic enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase has been used. The results show that well-developed chloroplasts in the stele probably occur in the subfamily *Epidendroideae* in all epiphytic representatives, while in the subfamily *Vanilloideae* they occur occasionally. The ultrastructure of chloroplasts from both areas is systematically different, so it is likely that their functions also differ. Apoplastic barriers are prominent in the roots and differentiate early during root development, which can effectively isolate chloroplasts in the stele from the cortex. Chloroplasts also occur in the sclerenchyma cells of the stele, where were identified hitherto unknown pits in cell walls that could provide gas exchange within the stele. Surprisingly, the PEP-carboxylase enzyme is localized within the endodermal passage cells and their surroundings, indicating the further heterogeneity of the photosynthetic functions of the chloroplasts along the radial direction of the root.

Keywords: *Orchidaceae*, aerial roots, chloroplasts, ultrastructure, photosynthesis

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický ekvivalent	Český ekvivalent
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	adenosintrifosfát
BSA	<i>bovine serum albumine</i>	hovězí sérový albumin
CAM	<i>crassulacean acid metabolism</i>	metabolismus kyselin u tlusticovitých rostlin charakterizující specifický typ fotosyntézy
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PEP	<i>phosphoenolpyruvate</i>	fosfoenolpyruvát
PEPC	<i>phosphoenolpyruvate carboxylase</i>	fosfoenolpyruvát karboxyláza; PEP-karboxyláza
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	fosfátový pufr s chloridem sodným
Rubisco	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</i>	ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza
SCC4	<i>single-cell C4</i>	jednobuněčný typ C4 metabolismu
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>	transmisní elektronová mikroskopie
UV	<i>ultraviolet light</i>	ultrafialové záření

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	3
2.1	Epifytismus.....	3
2.2	Vzdušné kořeny epifytických orchidejí.....	4
2.3	Anatomická stavba vzdušných kořenů	4
2.3.1	Rhizodermis	4
2.3.2	Primární kůra kořene	5
2.3.3	Střední válec	10
2.4	Chloroplasty.....	11
2.4.1	Chloroplasty v kořenech.....	11
2.4.2	Ultrastruktura chloroplastů.....	12
2.5	Fotosyntéza u orchidejí.....	15
2.5.1	Indikátory typů metabolismu a metody detekce.....	17
2.5.2	Fotosyntéza vzdušných kořenů epifytických orchidejí	21
3	Metodika.....	23
3.1	Analýza lokalizace chloroplastů v kořenech pomocí autofluorescence	23
3.1.1	Rostlinný materiál	23
3.1.2	Zpracování vzorků.....	26
3.1.3	Mikroskopické pozorování autofluorescence chloroplastů.....	26
3.2	Závislost výskytu chloroplastů ve středním válci na postupu diferenciaci kořene... ..	27
3.2.1	Rostlinný materiál	27
3.2.2	Anatomická analýza	27
3.2.3	Odběr materiálu a fixace	28
3.2.4	Histochemické barvení	28
3.2.5	Snímání.....	30
3.2.6	Analýza postupu diferenciaci pletiv	30
3.2.7	Výskyt chloroplastů.....	33
3.2.8	Statistické zpracování dat.....	33
3.3	Ultrastruktura chloroplastů	34
3.3.1	Pozorování pomocí transmisního elektronového mikroskopu	34
3.3.2	Metody hodnocení.....	35
3.4	Imunolokalizace enzymu PEP-karboxyláza	35
3.4.1	Příprava zásobních roztoků protilátek.....	36

3.4.2	Postup imunolokalizace PEP – karboxylázy	36
4	Výsledky.....	38
4.1	Analýza lokalizace chloroplastů v kořenech pomocí autofluorescence	38
4.1.1	Podčeleď <i>Epidendroideae</i>	38
4.1.2	Podčeleď <i>Vanilloideae</i>	44
4.2	Závislost výskytu chloroplastů ve středním válci na postupu diferenciaci kořene... 47	47
4.2.1	<i>Neobathiea spatulata</i>	47
4.2.2	<i>Acriopsis javanica</i>	52
4.2.3	<i>Vanilla planifolia</i>	58
4.3	Ultrastruktura chloroplastů	65
4.3.1	<i>Vanilla planifolia</i>	67
4.3.2	<i>Bulbophyllum biflorum</i>	70
4.3.3	<i>Dendrobium antennatum</i>	70
4.3.4	<i>Acriopsis javanica</i>	71
4.3.5	<i>Coryanthes leucocorys</i>	71
4.3.6	<i>Dinema polybulbon</i>	72
4.3.7	<i>Andinia longiserpens</i>	72
4.3.8	<i>Porroglossum lorenae</i>	74
4.3.9	<i>Eria hyacinthoides</i>	75
4.3.10	<i>Angraecum praestans</i>	76
4.3.11	<i>Dendrophylax funalis</i>	76
4.3.12	<i>Neobathiea spatulata</i>	77
4.3.13	<i>Cleisostoma yersinii</i>	77
4.3.14	<i>Taeniophyllum pusillum</i>	78
4.3.15	Ztenčiny buněčných stěn	79
4.4	Imunolokalizace enzymu PEP-karboxyláza	80
5	Diskuze.....	84
5.1	Diferenciaci kořenů.....	84
5.1.1	Exodermis.....	84
5.1.2	Endodermis.....	87
5.1.3	Střední válec	87
5.2	Chloroplasty.....	88
5.2.1	Obsah škrobu v chloroplastech	89
5.2.2	Neznámé orgány u druhu <i>Vanilla planifolia</i>	92

5.3	Ztenčiny buněčných stěn ve středním válci.....	93
5.4	Funkce chloroplastů v kořenech orchidejí.....	95
6	Závěr.....	99
7	Literatura.....	101

1 Úvod

Zatímco v mírných pásech jsou epifytické rostliny spíše okrajovou složkou ekosystémů, v tropických oblastech mohou představovat polovinu všech druhů rostlin v ekosystému (Kelly *et al.*, 2004) a hmotnost epifytických rostlin může v některých případech výrazně přesáhnout hmotnost hostitelského stromu (Hofstede *et al.*, 1993). Přitom se k výlučně epifytickému způsobu života adaptovali zástupci jen několika málo čeledí cévnatých rostlin, z nichž druhově nejpočetnější skupinou jsou orchideje (Zotz, 2016). Evoluční přechod na epifytický způsob života pro rostliny patrně znamená řadu adaptací na nejrůznějších úrovních. Jednou ze zjevných adaptací epifytických orchidejí jsou zelené kořeny, které obsahují chloroplasty a mohou fotosyntetizovat (Stern, 2014). Dosud publikované práce však nezohledňují možný výskyt chloroplastů v odlišných částech vzdušných kořenů a vždy studují kořeny jako celek. Je možné, že právě díky tomuto přístupu zůstává o fotosyntéze vzdušných kořenů stále velké množství otevřených otázek. V žádné práci dosud nebyla studována detailní struktura chloroplastů a ani nebyla ve vzdušných kořenech provedena lokalizace fotosyntetických enzymů, která se ukázala velice důležitou například u C4 rostlin (Sage, 1999; Pengelly *et al.*, 2011). Přitom je možné, že se chloroplasty vyskytují nejen v primární kůře kořenů, ale také ve středním válci (Stern, 2014). Pro porozumění fotosyntéze kořenů orchidejí je tedy nezbytné zjistit, ve kterých částech kořene se chloroplasty vyskytují, zda jsou navzájem izolované difuzními bariérami a pokud ano, tak zda se navzájem odlišují.

Hypotézy

1. Výskyt chloroplastů ve středním válci je u vzdušných kořenů epifytických orchidejí pravidlem.
2. Chloroplasty ve středním válci jsou izolované difuzními bariérami od chloroplastů v primární kůře.
3. Funkce chloroplastů ve středním válci a primární kůře se liší.

Cíle práce

Hlavní cíl: Poodhalit možnou úlohu chloroplastů ve středním válci kořenů epifytických orchidejí.

Dílčí cíle:

- 1) Porovnat přítomnost chloroplastů ve středním válci kořenů u různých fylogenetických skupin epifytických orchidejí.
- 2) Analyzovat závislost výskytu chloroplastů ve středním válci na postupu diferenciaci kořene.
- 3) Charakterizovat chloroplasty ve sklerifikovaných buňkách středního válce a v buňkách primární kůry.
- 4) Lokalizovat enzym PEP-karboxyláza ve středním válci a primární kůře.

2 Literární přehled

2.1 Epifytismus

Rostliny z čeledi vstavačovitě (*Orchidaceae*), dále jen orchideje, dnes můžeme nalézt téměř ve všech biomech na Zemi s výjimkou nejchladnějších vysokohorských oblastí a nejsušších pouštních oblastí (Stern, 2014). Většinu dosud známých druhů této čeledi tvoří epifytičtí zástupci, a to i přesto, že jsou orchideje primárně terestrické (Silvera *et al.*, 2009; Zotz, 2013; Givnish *et al.*, 2015).

Pojmem epifytismus lze označit symbiotický vztah typu komensalismu, kdy určitý druh využívá ke svému prospěchu jiný druh, jehož existenci ale negativně neovlivňuje (Benzing, 1987). Epifyty lze charakterizovat jako rostliny primárně klíčící a rostoucí na jiných rostlinách bez kontaktu s půdou a bez znaků parazitismu (Benzing, 1990; Zotz, 2013). Rostliny žijící tímto způsobem života najdeme převážně v korunách stromů, na větvích či kmenech. Epifytismus ale není specifikem pouze orchidejí. Typický je obzvláště pro nižší rostliny – řasy, lišejníky a kaprad'orosty. Krytosemenné rostliny na tento způsob života přešly později a jejich největší rozvoj spadá do období na přelomu třetihor a čtvrtohor (Benzing, 1990). Dnes tvoří epifytické druhy přibližně 10 % cévnatých rostlin, z toho tvoří orchideje více než 69 % (Zotz, 2013). Pro tuto diplomovou práci byly odebírány kořeny pouze druhů rostoucích tzv. obligátně epifyticky a také několika druhů vanilek, které vytvářejí dlouhé vzdušné kořeny s chlorenchymem. Obligátní epifyté (volně přeloženo z anglického *true epiphytes/holo-epiphytes*) nemají své kořeny v kontaktu s žádným substrátem a živiny nepřijímají z terestrických zdrojů (Kress, 1989; Benzing, 1990). Hemiepifyté (ang. *hemiepiphytes*) klíčí například v korunách stromů, ale jejich vzdušné kořeny se postupně dostanou do kontaktu se substrátem (Zotz *et al.*, 2013).

Přechod na epifytický způsob života se dle výsledků posledních fylogenetických studií odehrál u orchidejí vícekrát nezávisle. Jednou z možných příčin přechodu mohly být výrazné klimatické změny, které jejich vývoj doprovázely (Pearson & Palmer, 2000; Ramírez *et al.*, 2007; Silvera *et al.*, 2009, Kerbauy *et al.*, 2012; Givnish *et al.*, 2015). Dnes také víme, že tato klíčová inovace umožnila orchidejím osídlit novou niku a výrazně tak napomohla jejich rychlé speciaci, díky které dnes dosáhly postu jedné ze dvou největších čeledí krytosemenných rostlin s více než 27 000 druhy (Chase *et al.*, 2015; Givnish *et al.*, 2015). Obdobný dopad přechodu na epifytický způsob života lze pozorovat i u čeledi *Bromeliaceae* s druhým nejvyšším počtem epifytických druhů (Givnish *et al.*, 2014), která dnes čítá zhruba 3400 druhů (APG IV, 2016).

2.2 Vzdušné kořeny epifytických orchidejí

Klíčovou roli v četných adaptacích orchidejí k extrémním podmínkám epifytických stanovišť hrají modifikované adventivní kořeny tzv. vzdušné kořeny (ang. *aerial roots*). Oproti terestrickým kořenům, které jsou obklopeny okolním substrátem, jsou kořeny epifytů nuceny vypořádat se s kombinací výrazných stresových faktorů jako je vysoké ozáření, výrazné fluktuace teplot a periodický nedostatek vody a živin (Zotz, 2016). Zároveň musí být schopné přijímat vodu i minerální látky z výrazně odlišného prostředí.

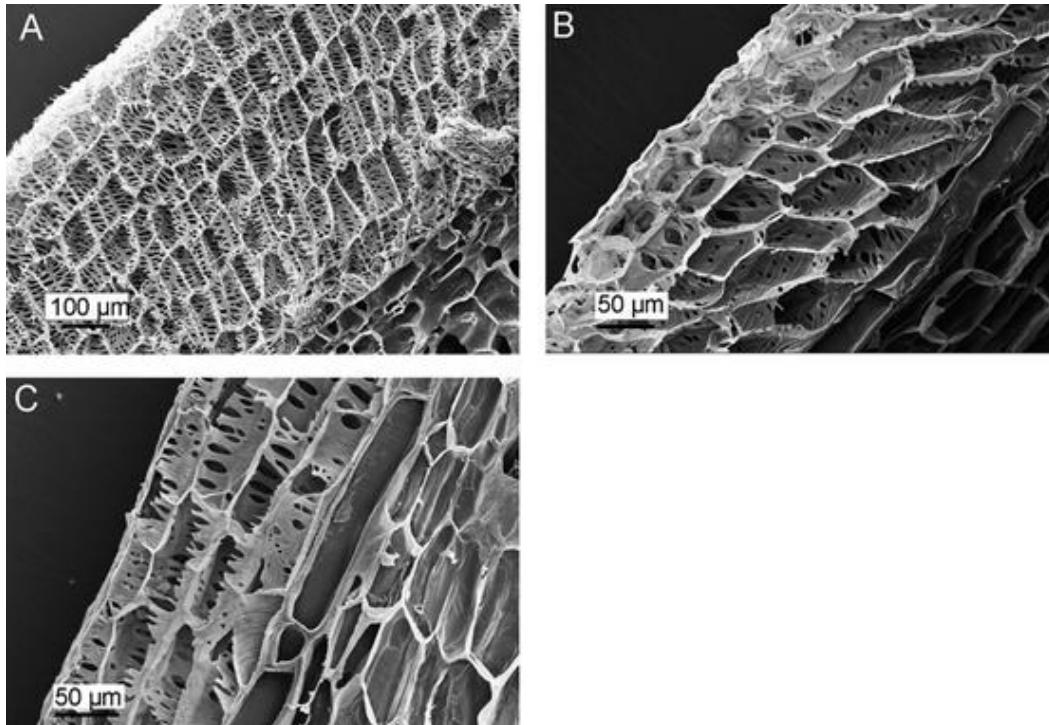
Mezi epifytickými a terestrickými kořeny lze dnes nalézt nápadné odlišnosti. Při porovnávání stavby kořenů epifytických a terestrických orchidejí došli autoři Moreira a Isaias (2008) k závěru, že kořeny těchto dvou skupin se odlišují hlavně v jejich průměru, charakteru a tloušťce rhizodermis a ve stupni vývoje buněk apoplastických bariér (exodermis, endodermis). Obdobné anatomické změny spojují autoři Thangavelu & Ayyasamy (2017) s nezbytným adaptováním kořenů na častý stres z nedostatku vody. Změnu anatomické stavby v závislosti na podmínkách růstu potvrzuje například schopnost tvorby kořenových vlásků u těch kořenů epifytických druhů, které se dostanou do kontaktu se substrátem (Ponert *et al.*, 2016; Thangavelu & Ayyasamy, 2017).

2.3 Anatomická stavba vzdušných kořenů

2.3.1 Rhizodermis

Za základní schopnost epifytů je považováno účinné zacházení s periodicky dostupnou vodou a živinami. To zahrnuje rychlý příjem, efektivní skladování a omezení vodních ztrát (Zotz & Winkler, 2013). Tyto funkce a mnohé další zastává u většiny epifytických kořenů specifická pokožka tzv. velamen (ang. *velamen radicum*).

Velamen je zpravidla vícevrstevná modifikovaná rhizodermis, tvořená mrtvými buňkami různých tvarů a směrem do středu kořene ohraničená modifikovanou svrchní vrstvou primární kůry – exodermis (Pridgeon, 1987; Poremski & Barthlott, 1988; Joca *et al.*, 2017). Buněčné stěny velamenu podléhají nepravidelnému sekundárnímu tloustnutí a lignifikaci. V průběhu tloustnutí se tvoří otvory a vzniká tak specifická druhově variabilní textura buněčných stěn (Obr. 1) popsaná například autory Sanford & Adanlawo (1973).



Obrázek 1 – Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Podélné řezy vzdušných kořenů ukazující textury buněčných stěn velamenu. (A) *Dendrobium densiflorum*, (B) *Dendrobium nobile*, (C) *Epidendrum secundum*. – převzato z Roth-Nebelstick *et al.* (2017)

Podstatnými funkcemi velamenu je rychlý příjem a pomalá ztráta vody. Zásadní roli zde hraje již zmiňovaná buněčná stěna. Suchý velamen je díky své stavbě schopen být plně saturován už během první minuty od kontaktu s vodou (Zotz & Winkler, 2013). Zadržování vody a její pomalá ztráta odparem poté koreluje s množstvím vrstev velamenu (Zotz & Winkler, 2013). Spolu s příjmem vody je charakterem buněčných stěn ovlivňován i příjem živin a jejich zadržení. Například výsledky autorů Zotz & Winkler (2013) a Joca *et al.* (2017) ukázaly, že v buněčných stěnách velamenu dochází k zadržování kationtů, a to díky zápornému náboji přítomných pektinů. Další poměrně nedávno doloženou funkcí velamenu je účinná ochrana před UV-B zářením, umožněná díky stálé přítomnosti flavonoidů v buněčných stěnách velamenu (i exodermis) u ozářených kořenů epifytických orchidejí (Chomicki *et al.*, 2015).

2.3.2 Primární kůra kořene

2.3.2.1 Apoplastické bariéry – endodermis a exodermis

U vyšších rostlin, tedy i u orchidejí, vstupují voda a živiny povrchem kořene a poté se pohybují směrem k vodivým pletivům středního válce. Pohyb vody a solutů poté může probíhat dvěma základními cestami. Apoplastem jsou molekuly a ionty transportovány kontinuem prostor v buněčných stěnách, naopak symplastický transport probíhá mezi protoplasty buněk

díky propojení plasmodesmy (Taiz *et al.*, 2015). U vzdušných kořenů orchidejí, kde povrch kořene tvoří mrtvé buňky velamenu, je první živou vrstvou ovlivňující příjem a selekci látek vrstva exodermis. Jedná se o specifický typ hypodermis (vnější vrstva primární kůry, jejíž buňky mají modifikované buněčné stěny), která zde plní funkci první apoplastické bariéry (Enstone *et al.*, 2002). Druhou apoplastickou bariéru tvoří poté vnitřní vrstva primární kůry – endodermis. Obě tyto bariéry jsou si u orchidejí anatomicky podobné, zpravidla jsou jednovrstevné a obsahují specifické propustné buňky (viz níže) (Dycus & Knudson, 1957; Moreira & Isaias, 2008).

Hlavní funkcí obou těchto bariér je omezení volného pohybu molekul prostorem buněčných stěn a tím zajištění selektivního příjmu (Peterson & Enstone, 1996). V případě endodermis je nutné ještě zmínit důležité funkce, které jsou společné pro všechny rostliny s kořenovou endodermis a které jsou umožněné její specifickou stavbou a složením buněčných stěn. Je to především schopnost zabránění zpětnému úniku látek ze středního válce díky vytvoření Casparyho proužků (Peterson & Enstone, 1996; Enstone *et al.*, 2002), dále mechanická podpora v pokročilých stádiích vývoje a zábrana průniku patogenů.

Buňky endodermis i exodermis podléhají podobnému vývoji, kdy prochází celkem třemi vývojovými stádii (Peterson & Enstone, 1996; Enstone *et al.*, 2002; Moreira & Isaias, 2008). V primárním stádiu dochází k ukládání ligninu, případně i suberinu do oblasti primárních buněčných stěn a vznikají tak Casparyho proužky. Ve většině případů, a to u endodermis i exodermis, následují další vývojová stádia, nicméně například v případě exodermis terestrických kořenů orchidejí se zde vývoj často zastaví (Moreira & Isaias, 2008). Se zvětšující se vzdáleností od kořenové špičky pokračuje vývoj do sekundárního stádia, dochází k ukládání vrstev suberinu na vnitřní povrch buněčných stěn a vznikají tak suberinové lamely (Peterson & Enstone, 1996; Enstone *et al.*, 2002). Třetí stádium je poté charakteristické tvorbou tzv. O-/U-ztlustlin, které jsou utvořeny rovnoměrným či nerovnoměrným dostředivým ukládáním sekundární buněčné stěny za postupného zmenšování oblasti protoplastu buňky. Tato buněčná stěna je označována také jako terciální, protože její uložení představuje třetí stádium vývoje endodermální/exodermální buňky, a často lignifikuje (Peterson & Enstone, 1996; Enstone *et al.*, 2002). Různé parametry, jako jsou například nepříznivé podmínky prostředí, rychlost růstu kořene nebo tlak na selektivitu příjmu, ovlivňují, jaká bude rychlost diference těchto bariér, tzn. v jaké vzdálenosti od kořenové špičky bude určité stádium již přítomno. Tato skutečnost je dobře popsána u různých rostlinných druhů (Cruz *et al.*, 1992; Enstone *et al.*, 2002; Karahara

et al., 2004; Meyer *et al.*, 2009; Líška *et al.*, 2016). U vzdušných kořenů orchidejí však doposud intenzivněji zkoumána nebyla.

Pro lepší pochopení funkcí obou těchto bariér je nutné zmínit, že i když jsou si tyto struktury podobné, existují mezi nimi značné rozdíly, a to například v jejich struktuře, výskytu, plasticitě odpovědi na podmínky prostředí nebo v synchronizaci diferenciací (Enstone *et al.*, 2002).

2.3.2.2 Endodermis

Vnitřní vrstva primární kůry, endodermis, je klíčovou apoplastickou bariérou, která se nachází u většiny cévnatých rostlin. Většinou je jednovrstevná, nicméně například některá halofyta vytváří v kořenech vícevrstevnou endodermis jako adaptaci na vysokou salinitu (Flowers *et al.*, 1986; Inan *et al.*, 2004). U orchidejí byla zatím vždy pozorována pouze jedna vrstva endodermis (Stern, 2014).

Buňky vrstev endodermis a exodermis prochází stejnými stádii. U epifytických orchidejí jsou zde nejčastěji pozorována pokročilejší stádia, stádium suberinové lamely nebo terciálních lignifikovaných buněčných stěn (Stern, 2014). Naopak pro endodermální buňky u terestrických orchidejí je typické dlouhodobé setrvání ve stádiu Casparyho proužků (Stern, 2014). Některé buňky endodermální vrstvy jsou označovány jako tzv. propustné (ang *passage cells*) (Peterson & Enstone, 1996). Tyto buňky lze nalézt jak v endodermis, tak v exodermis a v obou místech mají opožděný vývoj oproti okolním buňkám v téže vrstvě (Peterson & Enstone, 1996). Přejít okolních buněk do druhého a třetího stádia není zpravidla synchronní, ale objevuje se nejprve u buněk naproti floémovým pólům středního válce (Peterson & Enstone, 1996). Propustné buňky lze naopak pozorovat nejčastěji naproti pólům protoxylému, což zajišťuje vyšší efektivitu transportu (Peterson & Enstone, 1996). Množství propustných buněk endodermis u epifytických orchidejí dle autorů Joca *et al.* (2017) pozitivně koreluje s tloušťkou velamenu a pravděpodobně se tak jedná o strategii na zvýšení účinnosti transportu vody a solutů.

2.3.2.3 Exodermis

Exodermis lze pozorovat jednovrstevnou, například u druhů *Zea mays*, *Oryza sativa* a *Allium cepa* (Perumala *et al.*, 1990; Miyamoto *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2009), i vícevrstevnou, a to například u některých druhů rodu *Typha* (Seago *et al.*, 1999), *Iris* (Meyer *et al.*, 2009) nebo u druhu *Phragmites australis* (Soukup *et al.*, 2002). V případě kořenů orchidejí byla u většiny dosud známých druhů pozorována pouze jednovrstevná exodermis

(Stern, 2014). Nicméně některé starší práce uvádějí, že by se u některých druhů mohla vyskytovat až třívrstevná exodermis (Häfliger, 1901). Nejasná je dodnes situace zejména u některých zástupců rodu *Vanilla*. U epifytických orchidejí se jedná o vrstvu velice důležitou z důvodu absence živé rhizodermis na povrchu kořenů, proto je zde rozepsána podrobněji.

Podle charakteru vývoje lze exodermis rozdělit na dva typy. U epifytických orchidejí najdeme převážně tzv. dimorfní exodermis. Ta je charakteristická dlouhými suberinizovanými buňkami (které u epifytických kořenů často přecházejí do terciálního stádia vývoje a protoplast odumírá) střídající se s krátkými buňkami, které jsou označovány podobně jako u endodermis jako buňky propustné (ang. *passage cells*) (Obr. 2) (Pridgeon, 1987; Peterson & Enstone, 1996; Hose *et al.*, 2001; Moreira & Isaias, 2008). U těchto buněk je buďto tvorba suberinové lamely opožděna, nebo setrvávají ve stádiu Casparyho proužků (Hose *et al.*, 2001).



Obrázek 2 – Dimorfní exodermis *Acriopsis javanica*. Podélný řez kořenem, barveno Sudan Red 7B (Sigma). Krátké propustné buňky, dlouhé buňky s obarvenou suberinovou lamelou. Měřítka = 50 μ m.

Uniformní exodermis, u které se suberinová lamela ukládá u všech buněk rovnoměrně, nebyla u epifytických orchidejí pozorována (Sanford & Adanlawo, 1973; Hose *et al.*, 2001; Moreira & Isaias, 2008). Přechod většiny buněk do sekundárního či terciálního stádia vývoje zajišťuje mechanickou podporu kořene a zároveň spolu s velamenem zabraňuje ztrátám vody z oblasti primární kůry (Dycus & Knudson, 1957; Sanford & Adanlawo, 1973).

Propustné buňky hrají v exodermis zásadní roli v selektivním příjmu solutů. V případě kořenů s velamenem jsou tyto buňky prvními živými buňkami, jejichž cytoplazmatická membrána je v kontaktu s roztokem a přejímají tak funkci živé rhizodermis. Okolní buňky mají většinou již uloženu suberinovou lamelu, která zabraňuje kontaktu látek v apoplastu s plazmatickou membránou, což brání jejich vstupu do buňky. U propustných buněk je díky

přítomnosti Casparyho proužků omezen radiální transport prostorem buněčných stěn. Přijímané soluty jsou v této části transportu nuceny přejít do symplastu difuzí nebo pomocí specifických přenašečů na plazmatické membráně (Peterson & Enstone, 1996; Ma *et al.*, 2006; Barberon & Geldner, 2014), která díky absenci suberinové lamely zůstává přístupná. Symplastický transport poté pokračuje díky propojení propustných buněk a buněk střední vrstvy primární kůry pomocí četných plasmodesmů (Benzing *et al.*, 1982; Hose *et al.*, 2001). Dle autorů Joca *et al.* (2017) počet propustných buněk v exodermis negativně koreluje s počtem vrstev velamenu. Jejich množství a distribuce v exodermis může být také ovlivněna například orientací kořene vůči podkladu, a to z důvodu, že se jedná o buňky, skrz které zpravidla vstupují do oblasti primární kůry hyfy mykorhizních hub (Esnault *et al.*, 1994; Chomicki *et al.*, 2014). V případě endodermis se mykorhizní houby v propustných buňkách nevyskytují (Chomicki *et al.*, 2014).

Pouze u epifytických orchidejí je možné pozorovat vedle propustných buněk útvary zvané tilosomy. Jedná se o výrůstky vnitřních periklinálních buněčných stěn buněk nejspodnější vrstvy velamenu (tzv. endovelamenu), které přímo sousedí s propustnými buňkami (Pridgeon *et al.*, 1983; Kedrovski & Sajo, 2019). Tyto výrůstky se utváří v elongační zóně kořene a po jejich diferenciaci lze odlišit celkem 7 morfologických typů (Pridgeon *et al.*, 1983; Kedrovski & Sajo, 2019). Jejich přímý kontakt s propustnými buňkami a zároveň jejich značná podobnost ve struktuře a vývoji s transferovými buňkami vedla autory poslední studie k navržení jejich možných funkcí. Výrůstky zvyšují povrch buňky a s tím může narůstat i výměna látek mezi apoplastem a symplastem (Kedrovski & Sajo, 2019). Zároveň poté ve starších částech kořene by tyto výrůstky mohly směřovat soluty do propustných buněk (Kedrovski & Sajo, 2019). Předchozí studie uvažují ještě o dalších funkcích jako je například omezení průniku patogenů nebo možná redukce transpirace (Pridgeon *et al.*, 1983), nicméně bližší informace například o přítomnosti plasmodesmat, případné lignifikaci nebo o možné fyziologii transportu zatím zcela chybí.

2.3.2.4 Střední část primární kůry

Další částí primární kůry je kromě již zmíněných vrstev endodermis a exodermis i její střední část, někdy označovaná jako tzv. mesodermis. V této oblasti kořene dochází k ukládání zásobních látek, transportu plynů a produkci metabolitů (Lux *et al.*, 2004; Idris & Collings, 2019). U většiny jednoděložných rostlin, tedy i u orchidejí, je v mesodermis hlavním buněčným typem tenkostěnný parenchym s častými mezibuněčnými prostory (Lux *et al.*, 2004; Moreira & Isaias, 2008; Stern, 2014). V případě epifytických orchidejí se zde ale velice často vyskytují

také buňky značně odlišné od okolních buněk, a to svým tvarem, funkcí, modifikacemi buněčných stěn a obsahem. Jedná se o tzv. idioblasty, buňky často mrtvé, sloužící především jako zásobárna vody a mechanická podpora pletiva (Haberlandt, 1914; Benzing *et al.*, 1983; Stern, 2014; Joca *et al.*, 2017). Nejzajímavějším znakem, který odlišuje jednotlivé idioblasty, je variabilní tloušťka jejich buněčných stěn. U orchidejí bylo popsáno několik typů a to – uniformní, síťovité, Φ -ztlustliny (ang. *phi-thickening*) a specifické tloušťky tzv. tracheoidálních idioblastů, které jsou vývojově podobné cévám (Moreira & Isaias, 2008; Joca *et al.*, 2017; Idris & Collings, 2019). Kromě idioblastů se zde mohou nacházet i lyzigenní interceluláry zajišťující pravděpodobně transport plynů pletivem (Benzing *et al.*, 1983). To je důležité zpravidla i proto, že je zde častá přítomnost chloroplastů a například v případě bezlistých orchidejí tak mohou kořeny sloužit jako hlavní zdroj asimilátů (Kwok-ki *et al.*, 1983; Winter *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 2010). Zároveň se také jedná o místo hlavního výskytu houbových hyf mykobiontů a pravděpodobně pouze v mesodermis vznikají funkční mykorhizní struktury, tzv. pelotony (Lux *et al.*, 2004; Rasmussen & Rasmussen, 2009).

U vzdušných kořenů epifytických orchidejí mohou interceluláry střední vrstvy primární kůry navazovat na tzv. provzdušňovací jednotky, také označované jako pneumatody (Haberlandt, 1914; Benzing *et al.*, 1983). Jedná se o strukturu složenou z několika buněk velamenu a přiléhajících buněk vrstvy exodermis (Haberlandt 1914; Benzing *et al.*, 1983). Zásadním znakem je velmi silná impregnace buněk velamenu ligninem, díky které je omezen vstup vody do oblasti pneumatody během sycení kořene vodou (Dycus & Knudson, 1957). Tato místa zůstávají suchá a na pohled bílá. I přesto, že dosud chybí studie zabývající se podrobněji funkcí pneumatod, je pravděpodobné, že umožňují výměnu plynů mezi fotosyntetizující primární kůrou a okolním prostředím (Benzing *et al.*, 1983; Carlsward *et al.*, 2006).

2.3.3 Střední válec

Základem středního válce je u jednoděložných rostlin včetně orchidejí polyarchní radiálně uspořádaný cévní svazek s vyšším počtem xylémových a floémových pólů. Uprostřed středního válce se může nacházet dřev (Pridgeon, 1987; Stern, 2014). Dřev je obvykle parenchymatická, nicméně u některých druhů buněčné stěny tloušťnou, lignifikují a vytváří se sklerenchym. S tímto typem dřev se setkáme například u *Vanilloideae* či *Epidendroideae* (Stern & Judd, 1999; Carlsward *et al.*, 2006; Stern, 2014). V některých případech se sklerenchym objevuje pouze v oblasti základního pletiva mezi xylémovými a floémovými póly cévního svazku, a to především ve starších částech kořenů (Stern & Judd, 1999; Moreira &

Isaias, 2008). Střední část dřene může i ve starších částech kořene zůstávat parenchymatická s četnými mezibuněčnými prostory (Thangavelu & Muthu, 2017). Periferii středního válce tvoří jedna až tři vrstvy pericyklu, ve kterém se zakládají postranní kořeny (Stern, 2014). Naproti xylémovým pólům se vyskytují tenkostěnné buňky pericyklu a zároveň jsou tímto směrem orientované i propustné buňky endodermis, patrně pro usnadnění transportu živin do xylému (Peterson & Enstone, 1996; Stern & Judd, 1999; Moreira & Isaias, 2008; Stern, 2014). Silnostěnné sklerifikované buňky (někdy označované jako buňky s O-ztlustlinami) lze v pericyklu najít naopak naproti floémovým pólům (Stern & Judd, 1999; Stern, 2014).

Výskyt chloroplastů v oblasti středního válce byl dosud popsán pouze v několika pracích, a to převážně u zástupců *Vanilloideae* a *Epidendroideae* (Stern & Judd, 1999; Ponert *et al.*, 2016).

2.4 Chloroplasty

Tato kapitola by mohla být velice obsáhlá, nicméně pro účely této práce se zaměřím především na strukturní a funkční odlišnosti chloroplastů ve vztahu k ozáření a k dalším faktorům, jako jsou různé způsoby fixace CO₂. Tyto odlišnosti zatím nebyly popsány pro chloroplasty v kořenech a z toho důvodu jsou zde často využívány údaje ze studií na listech.

2.4.1 Chloroplasty v kořenech

Nejen u orchidejí, ale i u dalších epifytů se vzdušnými kořeny a u některých dalších rostlin, lze v kořenech pozorovat přirozený výskyt chloroplastů. Zmínit zde můžeme například vzdušné kořeny různých druhů *Dracaena*, kořeny mangrovového druhu *Rhizophora mangle*, adventivní submerzní kořeny halofytního druhu *Tecticornia pergranulata* nebo vodní kapradiny *Azolla pinnata* (Gill & Tomlinson, 1977; Whatley & Gunning, 1981; Rich *et al.*, 2008; Jura-Morawiec *et al.*, 2020). Dnes víme, že lze také navodit vývoj chloroplastů vystavením terestrických kořenů světlu. Jako příklad lze uvést terestrické rostliny *Secale cereale* nebo *Convulvulus arvensis* (Heltne & Bonnet, 1970; Oliveira, 1982).

U orchidejí byl pozorován přirozený výskyt chloroplastů téměř ve všech orgánech rostlinného těla od listů přes květní části, stonky, pahlízy až ke kořenům (Hew & Yong, 2004). Vzdušné kořeny epifytických orchidejí jsou v přímém kontaktu se světlem i atmosférou a vývoj chloroplastů v nich tedy může být přirozeně indukován. V případě terestrických kořenů, u kterých je kontakt se světlem omezen, k vývoji chloroplastů nedochází (Benzing, 1990). Veškeré práce, ve kterých najdeme informace o chloroplastech v kořenech epifytických

orchidejí, se zabývají převážně snahou o objasnění způsobu fixace CO₂ v tomto orgánu. Práce, které by se zabývaly přímo přesnější lokalizací či ultrastrukturou chloroplastů v kořenech zatím chybí. Stejně tak i skutečnost, že se zde chloroplasty mohou vyskytovat ve dvou odlišných částech – ve středním válci a ve střední vrstvě primární kůry, zatím nebyla podrobně zkoumána.

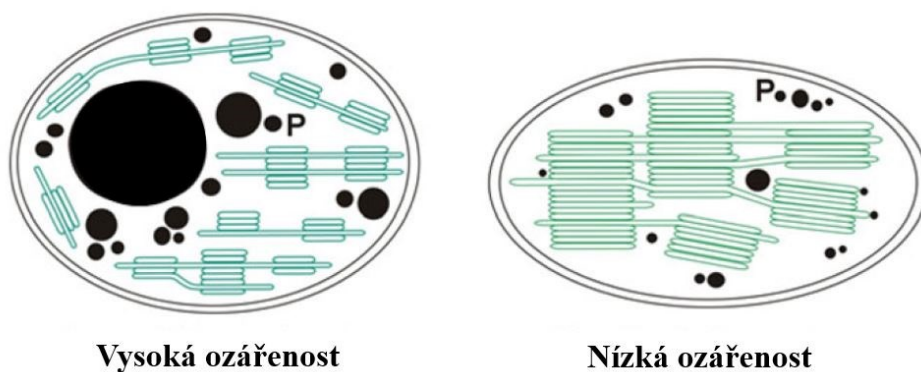
2.4.2 Ultrastruktura chloroplastů

Chloroplasty jsou semiautonomní organely endosymbiotického původu skládající se ze dvou membrán, mezimembránového prostoru, stromatu, thylakoidů, vlastní DNA a ribozomů. Thylakoidy, ploché membránové váčky, mohou být uspořádané ve sloupcích, tedy tzv. granální, nebo probíhající volně stromatem, tzv. stromatální. Na těchto membránách se nachází pigment-proteinové komplexy elektron-transportního řetězce, kde probíhá světelná fáze fotosyntézy, produkce ATP a NADPH. Temnostní fáze, Calvinův cyklus, probíhá ve stromatu, kde jsou přítomny potřebné enzymy jako je například enzym Rubisco (ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza). Součástí stromatu je také asimilační škrob v podobě škrobových zrn. Další součástí chloroplastů jsou také kulaté osmiofilní plastoglobuly sloužící jako zásobárna isoprenoidních lipidů, tokoferolu a dalších metabolitů (Bréhélin *et al.*, 2007; Lichtenthaler, 2013).

Uspořádání thylakoidů podobně jako obsah škrobu a množství i velikost plastoglobulů je významně ovlivněno mj. ozářeností (Obr. 3). Obecné rozdíly mezi ozářenými a zastíněnými chloroplasty v listech jsou uvedeny v Tabulce 1.

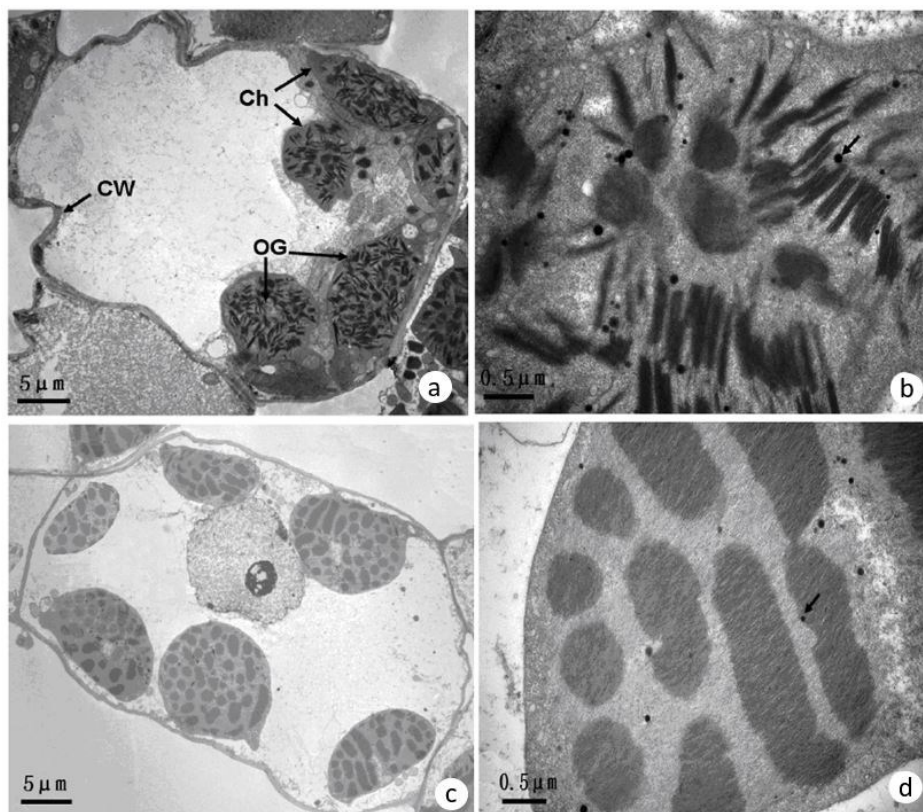
Vysoká ozářenost	Nízká ozářenost
nižší množství thylakoidů	vyšší množství thylakoidů
úzká grana	široká grana
méně thylakoidů na granum	více thylakoidů na granum
nižší počet gran v chloroplastu	vyšší počet gran v chloroplastu
vyšší množství plastoglobulů	menší množství plastoglobulů
vyšší obsah škrobu	nízký obsah škrobu

Tabulka 1 – Rozdíly v ultrastruktuře chloroplastů za odlišných ozářeností. – převzato a upraveno podle Lichtenthaler (2013)



Obrázek 3 – Schéma rozdílné ultrastruktury chloroplastů v ozářených a zastíněných listech. (P) plastoglobuly. – převzato a upraveno podle Lichtenthaler (2013)

Tyto rozdíly byly u orchidejí zatím pozorovány a popsány pouze u chloroplastů v listovém mesofylu, například v práci autorů Shao *et al.* (2014) na druhu *Anoectochilus roxburghii*, nikoli ale u chloroplastů v kořenech. Výsledky těchto autorů se shodovaly s obecnými rozdíly uvedenými v Tabulce 1, kdy spolu se snižující se ozářeností stoupalo množství chloroplastů, gran i granálních thylakoidů, a naopak klesalo množství i velikost plastoglobulů (Obr. 4) (Shao *et al.*, 2014).



Obrázek 4 – Odlišná ultrastruktura chloroplastů v listech orchideje *Anoectochilus roxburghii* vystavených různé ozářenosti. (a), (b) listy pod 50% ozářeností; (c), (d) listy pod 5% ozářeností. Černá šipka ukazuje plastoglobuly. (Ch) chloroplast, (CW, ang. *cell wall*) buněčná stěna, (OG, ang. *osmiophilic globules*) plastoglobuly, – převzato a upraveno podle Shao *et al.* (2014)

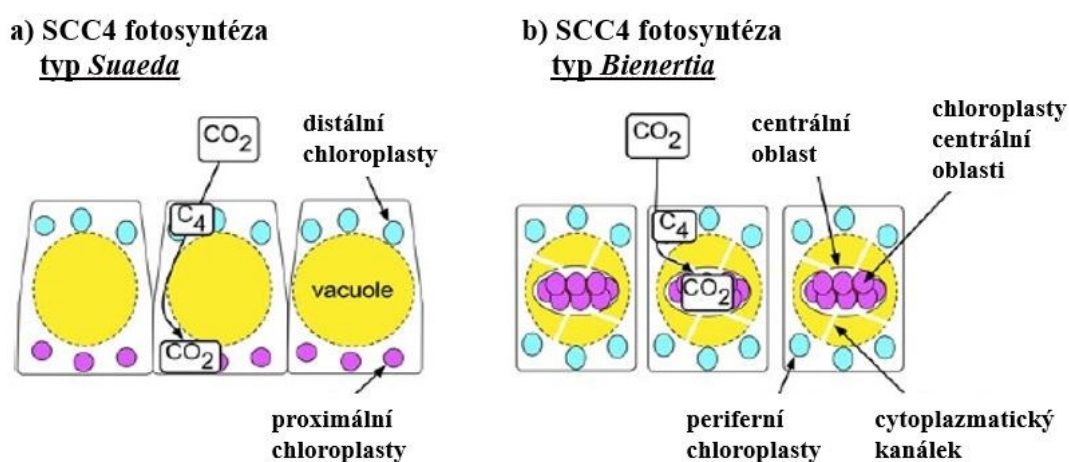
2.4.2.1 Změny ultrastruktury chloroplastů v závislosti na typu fixace CO₂

Odlíšné umístění chloroplastů a zároveň jejich strukturní a funkční dimorfismus je již dlouho známý z listů C₄ rostlin s typickou věnčitou anatomí listového pletiva (ang. *Kranz anatomy*) (Sage, 1999; Mai *et al.*, 2020). U těchto rostlin se dimorfní chloroplasty vyskytují ve dvou odlišných typech buněk – v mezofylových buňkách a v buňkách pochev cévních svazků. Primární fixace CO₂ enzymem PEP-karboxyláza (fosfoenolpyruvátkarboxyláza, PEPC) probíhá v cytoplazmě mezofylových buněk. Chloroplasty mezofylových buněk jsou typické absencí enzymu Rubisco, vyšším množstvím granálních thylakoidů a často absencí škrobových zrn (Sage, 1999). V těchto chloroplastech také probíhá zejména přeměna pyruvátu na fosfoenolpyruvát a u NADP-ME typu C₄ (ang. *NADP-dependent malic enzyme*) i redukce oxalacetátu na malát. Dekarboxylace a následná vlastní (sekundární) fixace CO₂ probíhá v buňkách pochev cévních svazků, kde je v chloroplastech akumulován enzym Rubisco. Tyto buňky jsou velké a mají většinou na svém povrchu difuzní bariéru v podobě suberinové vrstvy, která zajišťuje udržování vysoké koncentrace CO₂ uvnitř těchto buněk a snížení oxygenázové aktivity Rubisca (Sage, 1999; Mertz & Brutnell, 2014). Chloroplasty v nich jsou převážně agranální, typické absencí fotosystémů II na thylakoidálních membránách a vyšším obsahem škrobu (Sage, 1999; Mai *et al.*, 2020). Další odlišnosti v ultrastruktuře dimorfních chloroplastů a také v jejich pozici v buňkách pochev cévních svazků jsou poté spojené se specifickým typem C₄ metabolismu (NADP-ME; NAD-ME, ang. *NAD-dependent malic enzyme*; PEP-CK typ, ang. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*), které se liší místem dekarboxylace a sloučeninou přenášenou mezi buňkami (Voznesenskaya *et al.*, 1999; Voznesenskaya *et al.*, 2006).

Nejen ultrastruktura chloroplastů, ale často i jejich počty a velikosti mohou být v těchto dvou typech buněk odlišné. Uvádí se například, že mezofylové buňky C₄ rostlin obsahují méně chloroplastů než buňky pochev cévních svazků a zároveň mezofylové buňky C₄ rostlin pravděpodobně obsahují více chloroplastů než mesofylové buňky C₃ rostlin (Black & Mollenhauer, 1971; Stata, 2014).

Separace dimorfních chloroplastů ve specializovaných buňkách byla donedávna jedním z předpokladů pro C₄ metabolismus. Překvapivý byl proto postupný objev několika terestrických rostlin s tzv. jednobuněčným typem C₄ metabolismu (ang. *single-cell C₄, SCC₄*), poprvé popsány na halofytním druhu *Borszczowia aralocaspica* (*Suaeda aralocaspica*) (Freitag & Stichler, 2000; Voznesenskaya *et al.*, 2001). Dosud byly popsány dvě formy SCC₄. Tzv. *Suaeda* (*Borszczowia*) typ je charakteristický dlouhými mezofylovými buňkami s dimorfními

chloroplasty na opačných pólech buňky separované do těchto oblastí vakuolou (Obr. 5a) (Sharpe & Offermann, 2014). U typu *Bienertia* je naopak jeden typ chloroplastů soustředěn v centrální části a druhý na periférii buňky (Obr. 5b). I u tohoto typu jsou jednotlivé oblasti výrazně odděleny vakuolou a zároveň propojeny cytoplazmatickými kanálky (ang. *cytoplasmic channel*) (Sharpe & Offermann, 2014). Chloroplasty se odlišují velikostí, tvarem, množstvím gran, obsahem chlorofylu, přítomností a množstvím enzymů (př. Rubisco, PEP-karboxyláza a dalších) a specifických transportérů (Offermann *et al.*, 2011; Sharpe & Offermann, 2014). U typu *Bienertia* jsou dimorfní chloroplasty analogické chloroplastům ve specializovaných buňkách rostlin s věčnou anatomií (Offermann *et al.*, 2011).



Obrázek 5 – Dvě formy jednobuněčného C₄ metabolismu. a) Typ *Suaeda* typický separací dimorfních chloroplastů vakuolou do opačných pólů buňky; b) Typ *Bienertia* typický separací dimorfních chloroplastů do centrální a periferní části mezofylové buňky. Dimorfní chloroplasty odlišeny barevně. – převzato a upraveno podle Sharpe & Offermann (2014)

Za další specifický znak chloroplastů C₄ rostlin může být považováno i tzv. periferní retikulum nacházející se pod vnější chloroplastovou membránou (Lawton, 1988; Szczepanik & Sowiński, 2014). Tato struktura byla nicméně pozorována i u C₃ rostlin a její funkce zatím není známá (Szczepanik & Sowiński, 2014).

2.5 Fotosyntéza u orchidejí

U orchidejí se lze setkat se dvěma hlavními způsoby fixace CO₂ – C₃ metabolismus a CAM (ang. *Crassulacean acid metabolism*). Studie zabývající se určením převládajícího způsobu fixace CO₂ v listech či kořenech orchidejí zpravidla využívají ověřené metody pro detekci metabolických typů, jako je například stanovení poměru stabilních radioizotopů uhlíku, 24-hodinové měření změn obsahu organických kyselin a aktivit enzymů fixujících CO₂ nebo měření výměny CO₂ (viz dále kapitola Indikátory typů metabolismu a metody detekce).

Pro tenké listy orchidejí je dle provedených studií typický C3 metabolismus (Hew & Yong, 2004). Tento typ metabolismu je charakteristický primární fixací CO₂ enzymem Rubisco v Calvinově cyklu za následného vzniku tří-uhlíkaté stabilní sloučeniny. Tato fixace v listech probíhá ve stromatu chloroplastů mezofylových buněk.

V případě orchidejí s tlustými listy bylo zjištěno, že v tomto orgánu preferují CAM (Hew & Yong, 2004). Zde dochází k primární fixaci CO₂ pomocí enzymu PEP-karboxyláza za vzniku čtyř-uhlíkaté sloučeniny – oxalacetátu. Vlastní (sekundární) fixaci CO₂ poté zajišťuje enzym Rubisco v Calvinově cyklu. Na rozdíl od C4 metabolismu, kdy je tato dvojitá fixace oddělena prostorově, v případě CAM se jedná o oddělení časové. Během noci mají CAM rostliny otevřené průduchy, přijímají CO₂, PEP-karboxyláza váže hydrogenuhličitanový anion na fosfoenolpyruvát za vzniku oxalacetátu a ten je poté redukován na hlavní produkt fixace – malát (Cockburn *et al.*, 1985; Lüttge, 1987). Následuje transport malátu do vakuoly, kde je skladován. Během dne mají CAM rostliny průduchy zavřené, malát je dekarboxylován a enzym Rubisco zajišťuje sekundární fixaci CO₂ v C3 cyklu.

I přesto, že je sukulence daného orgánu často považována za základní znak spojený s CAM, zejména z důvodu vyšší kapacity orgánu pro uložení organických kyselin, tak bylo ukázáno, že i tenkolisté orchideje mohou využívat ve svých listech tento typ fixace CO₂. Ze studie Motomura *et al.* (2008) vyplývá, že některé tenkolisté druhy rodu *Cymbidium* vykazovaly znaky tzv. slabého CAM (ang. *weak CAM*). Tento typ nelze spolehlivě určit pouze podle stanovení poměru stabilních izotopů uhlíku (viz dále), jelikož hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ odpovídají často C3 rostlinám. Pro správnou identifikaci je tedy nutné využít ještě další doplňující metody jako například měření změn obsahu organických kyselin nebo stanovení aktivit dekarboxylačních enzymů (Silvera *et al.*, 2005; Motomura *et al.*, 2008). Naopak silné CAM (ang. *strong CAM*) je ekvivalent obligátního CAM, které odpovídá klasickému CAM často s typickými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ (viz kapitola Indikátory typů metabolismu a metody detekce).

Typ fotosyntézy v dané rostlině nesouvisí pouze s tloušťkou (sukulencí) daného orgánu. Jako další faktory ovlivňující převažující typ fixace CO₂ lze uvést například vývojové fáze orgánů nebo změny v podmínkách prostředí. U některých orchidejí již byla ukázána schopnost přepínání mezi C3 a CAM v jedné rostlině, a to po vystavení delší periodě sucha. Tato adaptace, kdy jsou rostliny schopné přejít z C3 metabolismu na CAM během nepříznivých podmínek, nese označení fakultativní CAM (ang. *facultative CAM*; C3-CAM). Hodnotami zastoupení stabilních izotopů uhlíku odpovídá slabému CAM a lze ji nalézt i u dalších epifytů (Motomura

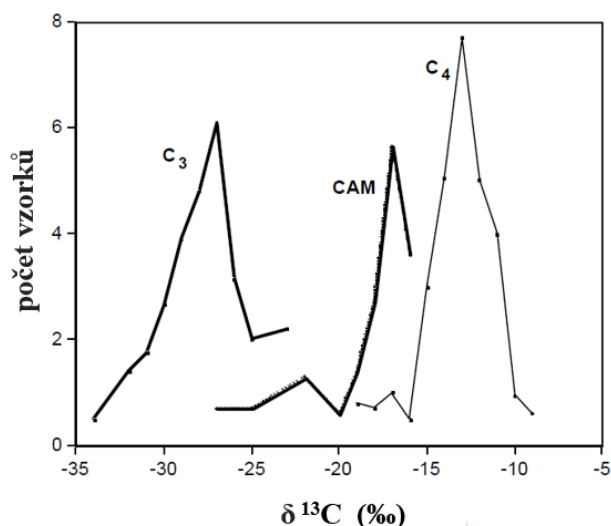
et al., 2008; Kerbaudy *et al.*, 2012). I přesto, že CAM zajišťuje značné omezení vodních ztrát, některé druhy po dlouhodobém působení sucha přechází ve svých listech na ještě úspornější variantu tzv. *CAM-idling*, kdy své průduchy vůbec neotevírají (Fu & Hew, 1982; Sipes & Ting, 1985). Noční slabá akumulace organických kyselin poté pravděpodobně vychází z vyrespirovaného CO₂ a tento typ fotosyntézy může být řazen pod slabé CAM (Szarek *et al.*, 1973; Motomura *et al.*, 2008).

Při studiu plasticity fotosyntézy během vystavování suchu došli autoři Rodrigues *et al.* (2013) u tenkolistého druhu *Oncidium Goldiana* k předpokladu, že by mohlo u některých druhů orchidejí docházet dokonce ke kompartmentaci fotosyntézy například mezi listy a pahlízami. Navrhli hypotézu, že limitující kapacita tenkých listů může být kompenzována přesunem tvorby organických kyselin do pahlíz, které jsou bez stomat, kryté kutikulou a propojené s listy aerenchymem podél cév (Rodrigues *et al.*, 2013). Tento druh orchideje se tak dle autorů řadí do rostlin přecházejících za sucha na fakultativní, prostorově oddělený CAM, i když samotné hodnoty získané měřením listů by odpovídaly C3 metabolismu (Rodrigues *et al.*, 2013).

2.5.1 Indikátory typů metabolismu a metody detekce

2.5.1.1 Hodnoty poměru stabilních izotopů uhlíku: ¹³C/¹²C (δ ¹³C)

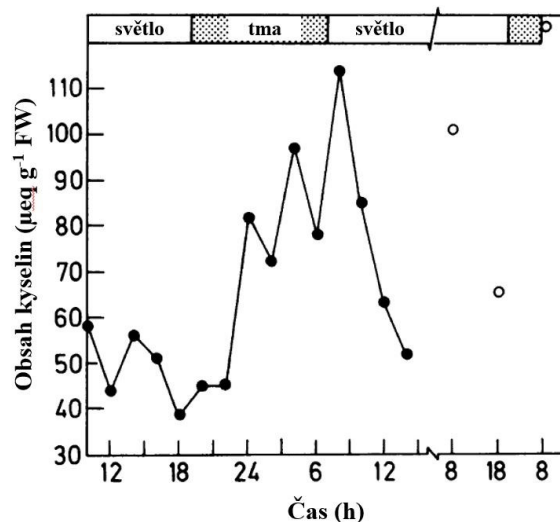
V závislosti na poměru stabilních izotopů uhlíku ¹³C/¹²C (δ ¹³C) získaném pomocí hmotnostní spektrometrie (ang. *mass spectrometry*, MS) lze u rostlinné biomasy určit spolu s dalšími parametry typ fixace CO₂. Hodnoty tohoto poměru uváděné pro CAM jsou -13‰ až -34‰ (průměrně okolo -17‰), pro C3 metabolismus -22‰ až -32‰ (průměrně okolo -27‰) a pro C4 metabolismus -19‰ až -8‰ (průměrně okolo -10‰) (Graf 1) (Lerman, 1975; Troughton, 1979; Hew & Yong, 2004). Tato metoda je nejen u orchidejí, ale i u dalších epifytů velmi často využívána, jelikož C4 rostliny obecně méně diskriminují těžší izotop uhlíku než C3 rostliny (Farquhar, 1983; Zotz & Ziegler, 1997; Martin *et al.*, 2010). Díky této metodě se například podařilo odhalit korelaci mezi tloušťkou listu a využíváním CAM, kdy silné listy epifytů vykazovaly hodnoty mezi -15‰ a -16‰, což odpovídá CAM (Hew & Yong, 2004). V práci autorů Zotz & Ziegler (1997) bylo díky stanovení poměrů stabilních izotopů uhlíku například zjištěno, že se množství CAM epifytů (i epifytických orchidejí) zvyšuje se snižujícím se množstvím srážek.



Graf 1 – Zastoupení izotopu ^{13}C v pletivech krytosemenných rostlin s různým typem fotosyntézy. – převzato a upraveno podle Hew & Yong (2004), data vychází z Lerman (1975)

2.5.1.2 Změny obsahu organických kyselin

Pro rostliny využívající CAM jsou charakteristické denní změny obsahu organických kyselin ve fotosyntetizujících orgánech (Goh *et al.*, 1977; Cockburn *et al.*, 1985; Lüttge, 1987). Hodnota pH vakuoly klesá během noci, kdy dochází k fixaci CO_2 PEP-karboxylázou a k následnému vzniku a hromadění malátu. Během dne naopak hodnota pH vakuoly stoupá v závislosti na translokaci malátu do cytoplazmy a jeho následné dekarboxylaci (Lüttge, 1987; Kerbaui *et al.*, 2012). Změny kyselosti jsou měřeny během 24-hodinové periody titrací (např. 0,01 N NaOH) (Goh *et al.*, 1977; Goh *et al.*, 1983; Martin *et al.*, 2010). Na kořenech orchidejí již byla tato metoda vyzkoušena, a to například u orchideje *Chiloschista usneoides* (Cockburn *et al.*, 1985). Výsledky tohoto měření ukázaly značný nárůst obsahu kyselin během noci a pokles během dne (Graf 2) (Goh *et al.*, 1983; Cockburn *et al.*, 1985). Přednostní tvorbu malátu při noční fixaci CO_2 lze poté ukázat například díky využití radioaktivního $^{14}\text{CO}_2$ (Goh *et al.*, 1983; Cockburn *et al.*, 1985).



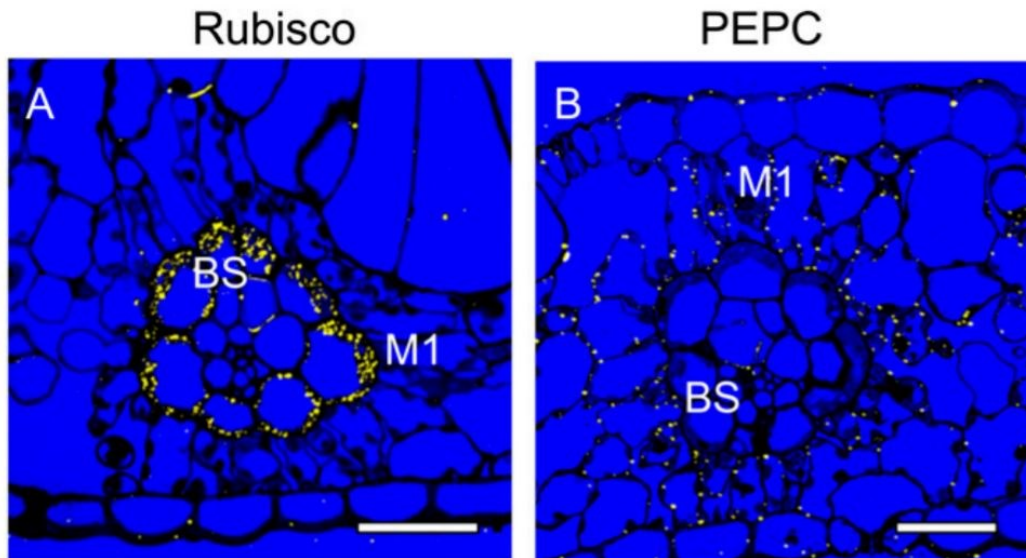
Graf 2 – Změny v obsahu organických kyselin v kořenech orchideje *Chiloschista usneoides* během denního cyklu. FW = ang. *fresh weight*. – převzato a upraveno podle Cockburn *et al.* (1985)

2.5.1.3 Aktivita fotosyntetických enzymů

Noční fixace CO₂ enzymem PEP-karboxyláza je typickým znakem rostlin využívajících CAM. Na začátku světelné periody proto bývá naměřena nízká aktivita, která se zvyšuje v pozdním odpoledni (Hew *et al.*, 1984; Kerbauy *et al.*, 2012). Spolu s aktivitou PEP-karboxylázy je často měřena i aktivita enzymu Rubisco. Vysoký poměr aktivit PEPC/Rubisco poukazuje v daném orgánu na možnou převládající fixaci CO₂ enzymem PEP-karboxyláza a zároveň se v provedených studiích shoduje s naměřenými hodnotami δ¹³C pro CAM (Hew *et al.*, 1996; Hew & Yong, 2004).

2.5.1.4 Imunolokalizace fotosyntetických enzymů

Imunolokalizace enzymů je imunohistochemická metoda, která umožňuje monitorovat umístění enzymu v buňkách daného orgánu. Ve studiích týkajících se fotosyntézy u C4 a CAM rostlin je využívána především lokalizace fotosyntetických enzymů Rubisco a PEP-karboxyláza (Voznesenskaya *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2017). Konkrétně u C4 rostlin s Kranz anatomíí listu je kompartmentace enzymů do mezofylových buněk a buněk pochev cévních svazků imunolokalizací velice dobře ukázána (Obr. 6) (Pengelly *et al.*, 2011).



Obrázek 6 – Imunolokalizace enzymů (A) Rubisco a (B) PEP-karboxyláza (PEPC) komerčně dostupnými protilátkami v listech kukuřice. BS = ang. *bundle sheath cells*, buňky pochev cévních svazků; M1 = mezofylové buňky přiléhající k BS buňkám. Měřítka = 40 µm. – převzato z Pengelly *et al.* (2011)

Pro silný signál a jednodušší lokalizaci je využívána především metoda nepřímé imunolokalizace pomocí značených sekundárních protilátek, které mají afinitu k primárním protilátkám detekujícím cílový protein. Fluorescenčně značené sekundární protilátky jsou poté snadno pozorovatelné ve fluorescenčním mikroskopu (tzv. imunofluorescence). Pro přesnější lokalizaci cílového proteinu v daných buňkách pomocí transmisního elektronového mikroskopu mohou být využity například koloidní zlaté částice konjugované se sekundární protilátkou (ang. *Immunogold localization*) (Hayat, 2000). Tato metoda již byla několikrát s úspěchem použita i při lokalizaci fotosyntetických enzymů Rubisco a PEP-karboxyláza (Ueno, 1998; Sui *et al.*, 2017). U orchidejí zatím imunolokalizace fotosyntetických enzymů využita nebyla. Prozatím existuje pouze několik prací, které tuto metodu využily k lokalizaci jiných enzymů, například při detekci glukosidázy v plodu *Vanilla planifolia* (Brillouet *et al.*, 2014).

2.5.1.5 Výměna CO₂

Cyklus výměny CO₂ v metabolickém typu CAM lze rozdělit celkem do čtyř fází. První fázi charakterizují otevřené průduchy během noci, probíhající fixace CO₂ a tvorba malátu. Ve druhé fázi dochází k poklesu aktivity PEP-karboxylázy a navýšení aktivity enzymu Rubisco. Fáze tři, probíhající během dne, je typická uzavíráním průduchů a dekarboxylací malátu. Ve čtvrté, poslední fázi dochází k zásadnímu poklesu obsahu organických kyselin a začínajícímu zvyšování vodivosti průduchů (Smith & Lüttge, 1985; Cockburn *et al.*, 1985;

Kerbaury *et al.*, 2012). Při ověřování přítomnosti CAM je monitorování tohoto cyklu výměny CO₂ během dne/noci velice často využíváno, v případě listů ještě spolu s pozorováním otevírání/zavírání průduchů (Goh *et al.*, 1977). V případě kořenů epifytických orchidejí, které neobsahují průduchy, je tato metoda také využívána, a to s překvapivě podobnými výsledky jako u studií na listech (Cockburn *et al.*, 1985).

2.5.2 Fotosyntéza vzdušných kořenů epifytických orchidejí

Interpretace dat ze studií zabývajících se asimilací uhlíku v kořenech epifytických orchidejí je oproti studiím na listech komplikovanější. Ze získaných dat většinou vyplývá, že nejčastějším typem fixace CO₂ v kořenech je CAM (Goh *et al.*, 1983; Hew & Yong, 2004; Martin *et al.*, 2010; Kerbaury *et al.*, 2012). Nicméně díky často nejednoznačným výsledkům při detekování tohoto typu metabolismu a zároveň díky testování prozatím nízkého počtu druhů existujících v této oblasti značné nejistoty.

Například využívání metody měření fluktuace obsahu organických kyselin ukázalo, že změny obsahu malátu v kořenech mohou být variabilní v rámci jednoho druhu i v rámci jednotlivých kořenů jedné rostliny (Motomura *et al.*, 2008). Autoři této studie (po stanovení $\delta^{13}\text{C}$ odpovídajícímu CAM) díky tomu charakterizovali u rodu *Phalaenopsis* tři typy dynamiky malátu. Tzv. obligátní CAM se shoduje s kolísáním hladiny malátu v listech CAM orchidejí, kdy se malát hromadí během noci a během dne je dekarboxylován (viz kapitola Fotosyntéza u orchidejí). V některých kořenech ale autoři naměřili vysoký denní obsah malátu bez fluktuace. Tento typ byl označen jako tzv. skrytý CAM (ang. *latent CAM*) a dále neobjasněn (Motomura *et al.*, 2008). Naopak stále nízký obsah malátu bez fluktuace v dalších kořenech byl označen za možný převažující C₃ metabolismus (Motomura *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009). Nicméně například v listech druhů s *CAM-idling* také bývá naměřena konstantně nízká akumulace organických kyselin. V tomto případě jsou v listech stomata uzavřená i během dne, využívá se převážně CO₂ uvolněný během respirace a jedná se o typ CAM (Sipes & Ting, 1985).

Pro správnou identifikaci převažujícího typu fixace CO₂ je proto důležité využívat kombinaci různých metod detekce. Například pouhé určení poměru stabilních izotopů uhlíku může být nepřesné až zavádějící, jak tvrdí autoři Silvera *et al.* (2005). Dle výsledků jejich studie provedené na 214 druzích vykazovalo pouze 21% druhů hodnoty zastoupení izotopů uhlíku ($\delta^{13}\text{C} = -14\text{‰}$ až -16‰) jednoznačně odpovídající CAM. Následná měření fluktuace obsahu malátu však odhalilo CAM u dalších 29 % druhů ve studovaném souboru (Silvera *et al.*, 2005).

Dalším znakem kořenů epifytických orchidejí, který musí být uvažován při studii fotosyntézy v tomto orgánu, je absence průduchů (Stern, 2014). Průduchy v listech CAM rostlin jsou během dne zavřené a díky tomu rostlina dokáže snížit ztráty vody (viz kapitola Výměna CO₂) a zároveň uzavřené průduchy fungují jako bariéra pro únik CO₂, který se uvolňuje během dekarboxylace malátu v průběhu dne. V kořenech epifytických orchidejí pomáhá redukovat vodní ztráty především velamen, nicméně jaký je zde způsob regulace výměny plynů zatím není jasné. Například ve studii autorů Cockburn *et al.* (1985) na kořenech bezlisté epifytické orchideje *Chiloschista usneoides* výsledky z měření aktivit PEP-karboxylázy, kolísání hladin malátu a stanovení poměru izotopů uhlíku odpovídaly přítomnosti CAM. Dále i přes nepřítomnost průduchů autoři naměřili nízké ztráty CO₂ během denní fáze dekarboxylace (Cockburn *et al.*, 1985). Tato varianta CAM byla poté autory označena jako tzv. astomatální CAM (ang. *astomatal CAM*). Určitou roli při výměně plynů v kořenech by mohly například hrát pneumatody (viz kapitola Střední část primární kůry). Další práce, které by tuto problematiku pomohly objasnit zatím ale chybí.

V případě bezlistých orchidejí mohou být vzdušné kořeny hlavním zdrojem asimilátů (Hew & Yong, 2004). U kořenů těchto orchidejí byl také pozorován čistý příjem CO₂ (Hew & Yong, 2004). Naopak u kořenů orchidejí s listy, i přesto, že vykazovaly znaky CAM jako je noční akumulace malátu a hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ odpovídající CAM, nikdy čistá fotosyntéza naměřena nebyla (Hew & Yong, 2004). Jedním z uvažovaných vysvětlení je vysoký podíl respirace či fotorespirace (Dycus & Knudson, 1957). Druhou možností je, že vodou saturovaný velamen na povrchu kořenů může bránit výměně plynů jako difuzní bariéra a zároveň může snižovat množství dopadajícího světla potřebného pro fotosyntézu (Cockburn *et al.*, 1985; Hew & Yong, 2004; Moreira *et al.*, 2009). Jelikož zatím není známý ani mechanismus výměny plynů ve vzdušných kořenech, nelze odhadnout, jak významný vliv mají tyto jednotlivé navržené faktory.

3 Metodika

Tato práce se skládá celkem ze 4 experimentů. Hlavním cílem bylo analyzovat výskyt chloroplastů v kořenech epifytických orchidejí z různých fylogenetických skupin a zároveň poodhalit jejich možné odlišnosti v ultrastruktuře. Byl také detailně zmapován postup diferenciaci pletiv kořenů od špičky k bázi včetně oblastí, ve kterých byly lokalizovány chloroplasty. V posledním experimentu se poprvé v historii podařilo ve vzdušných kořenech lokalizovat enzym PEP-karboxylázu. Detaily budou vysvětleny v následujícím textu.

3.1 Analýza lokalizace chloroplastů v kořenech pomocí autofluorescence

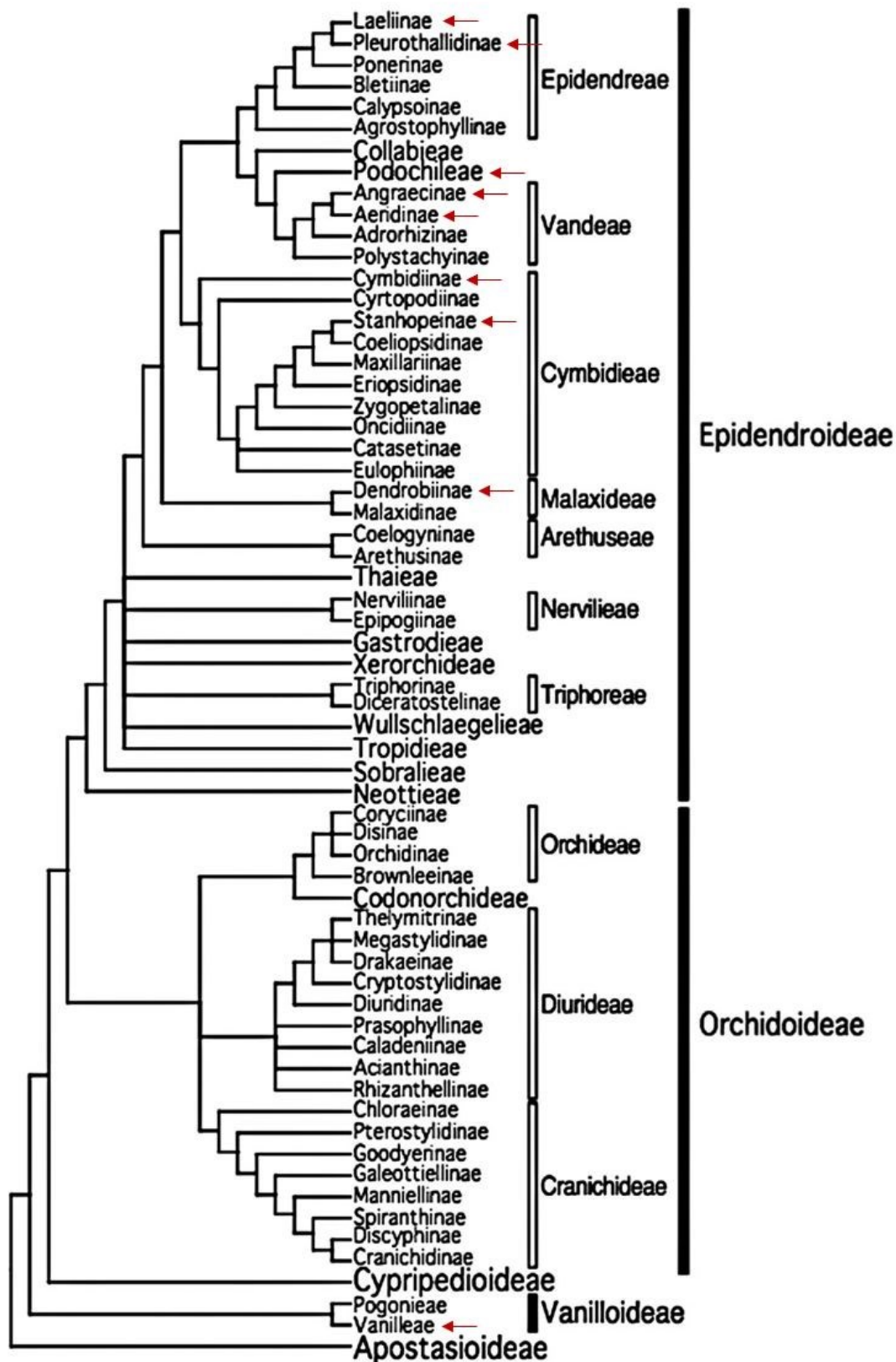
V tomto experimentu bylo hlavním cílem odhalit přítomnost chloroplastů ve středním válci kořenů u různých fylogenetických skupin epifytických orchidejí. Vizualizace chloroplastů byla provedena pomocí autofluorescence s využitím epifluorescenčního a konfokálního mikroskopu. Na tento experiment navazuje kapitola Ultrastruktura chloroplastů, ve které byla přesná lokalizace chloroplastů analyzována pomocí transmisního elektronového mikroskopu.

3.1.1 Rostlinný materiál

Pro tento experiment byly vybrány druhy tak, aby co nejlépe pokryly fylogenetickou diverzitu epifytických orchidejí (Tab. 2; Obr. 7; Chase *et al.*, 2015; Givnish *et al.*, 2015). Z podčeledí *Cypripedioideae* a *Orchidoideae* nebyly zařazeni žádní zástupci, protože se zde vyskytují pouze jednotlivé epifytické rostoucí druhy, které mají ve skoro všech případech kořeny zanořené do epifytické rostoucí mechů. Odběry vzdušných kořenů jednotlivých druhů probíhaly průběžně v období od listopadu 2018 do října 2020, především ve sbírkách orchidejí Botanické zahrady hl. m. Prahy a také ve skleníku Katedry experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Při odběru byly preferovány vždy živé, narostlé kořeny s aktivně rostoucí kořenovou špičkou a nepřiléhající k podkladu (substrátu). Kořeny byly odebírány celé, od špičky až těsně k bázi navazující na prýt.

Druh	Subtribus	Tribus	Podčeleď
<i>Vanilla planifolia</i>	-	<i>Vanilleae</i>	<i>Vanilloideae</i>
<i>Vanilla pompona</i>	-	<i>Vanilleae</i>	<i>Vanilloideae</i>
<i>Vanilla madagascariensis</i>	-	<i>Vanilleae</i>	<i>Vanilloideae</i>
<i>Bulbophyllum biflorum</i>	<i>Dendrobiinae</i>	<i>Dendrobieae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Dendrobium antennatum</i>	<i>Dendrobiinae</i>	<i>Dendrobieae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Acriopsis javanica</i>	<i>Cymbidiinae</i>	<i>Cymbidieae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Coryanthes leucocorys</i>	<i>Stanhopeinae</i>	<i>Cymbidieae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Dinema polybulbon</i>	<i>Laeliinae</i>	<i>Epidendreae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Andinia longiserpens</i>	<i>Pleurothallidinae</i>	<i>Epidendreae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Porroglossum lorenae</i>	<i>Pleurothallidinae</i>	<i>Epidendreae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Eria hyacinthoides</i>	<i>Eriinae</i>	<i>Podochileae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Angraecum praestans</i>	<i>Angraecinae</i>	<i>Vandaeae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Dendrophylax funalis</i>	<i>Angraecinae</i>	<i>Vandaeae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Neobathiea spatulata</i>	<i>Angraecinae</i>	<i>Vandaeae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Cleisostoma yersinii</i>	<i>Aeridinae</i>	<i>Vandaeae</i>	<i>Epidendroideae</i>
<i>Taeniophyllum pusillum</i>	<i>Aeridinae</i>	<i>Vandaeae</i>	<i>Epidendroideae</i>

Tabulka 2 – Seznam a systematické zařazení zkoumaných druhů orchidejí.



Obrázek 7 – Fylogenetický strom pro čeleď *Orchidaceae*. Šipky ukazují na subtriby, ze kterých byly vybrány druhy pro analýzu výskytu chloroplastů. – upraveno a převzato z Chase *et al.* (2015)

3.1.2 Zpracování vzorků

Nejprve byla u každého kořene změřena celková délka a v jeho polovině byl žiletkou odebrán segment o délce 0,7-1 cm. Ze segmentu byly následně připraveny řezy na ručním mikrotomu o síle cca 100-120 μm . Část řezů byla ihned uzavřena na podložní sklíčko do 65% glycerolu a na dalších řezech bylo provedeno histochemické barvení roztokem okyseleného floroglucinolu (1% floroglucinol rozpuštěný v 18% HCl, w/v) pro detekci lignifikovaných buněčných stěn středního válce. Obarvené řezy byly uzavřeny do okyseleného glycerolu (50% glycerol s 5% H₂SO₄) a snímány ve světelném poli. Čerstvý materiál byl takto zpracován vždy ihned po odběru.

3.1.3 Mikroskopické pozorování autofluorescence chloroplastů

Výskyt chloroplastů ve středním válci byl monitorován díky autofluorescenci chloroplastů při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). Pro monitorování a pořizování fotodokumentace byl využit epifluorescenční mikroskop Olympus BX51 (Olympus Optical Co.) s digitální 3 čipovou CCD kamerou ApogeeAlta U4000 (Apogee Instruments Inc.). Digitální obraz byl poté upraven v programu Micro CCD.

Většina fluorescence chloroplastů pochází z fluorescence chlorofylu a, který po zachycení energie excitačního záření část energie emituje jako záření o delší vlnové délce. Při pozorování řezů ve fluorescenčním mikroskopu jsem hodnotila, zda se chloroplasty vyskytují pouze v primární kůře, ve středním válci kořene nebo na obou místech zároveň. V případě, že se chloroplasty vyskytovaly ve středním válci, jsem posuzovala, zda jsou distribuovány pouze ve dřeni nebo i v buňkách základního pletiva mezi xylémovými a floémovými póly radiálního cévního svazku (parenchym vodivých pletiv). Ve starších částech kořene dochází u některých druhů orchidejí ke sklerifikaci středního válce (buněčné stěny parenchymatických buněk tloustnou a lignifikují), která se mj. projeví i silnou autofluorescencí lignifikovaných buněčných stěn. V těchto buňkách je poté v epifluorescenčním mikroskopu obtížné chloroplasty identifikovat. Pro ověření přítomnosti chloroplastů ve sklerifikovaných buňkách tak bylo využito pozorování pomocí konfokálního mikroskopu.

Pro tuto lokalizaci byl vybrán jeden modelový druh *Neobathiea spatulata*, u kterého jsou ve starších částech kořene při pozorování pod epifluorescenčním mikroskopem patrné silné a lignifikované buněčné stěny, jejichž vysoká autofluorescence znemožňuje přesné určení výskytu chloroplastů uvnitř těchto buněk. Z čerstvě odebraného kořene byl odříznut segment

z bazální části kořene, tj. v pozici P4 (viz dále), ze kterého bylo připraveno několik řezů o síle 100-150 μm . Řezy byly uzavřeny na podložní sklíčko do 65% glycerolu a následně pozorovány a nasnímány na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 v Laboratoři konfokální a fluorescenční mikroskopie PřF UK, Viničná 7. Emisní spektra pro buněčné stěny byla nastavena podle λ scanu na 500-600 nm a pro chloroplasty na 650-750 nm.

3.2 Závislost výskytu chloroplastů ve středním válci na postupu diferenciaci kořene

Tento experiment byl zaměřen na analýzu postupu diferenciaci pletiv vzdušných kořenů. Hlavním cílem bylo ověřit, zda se liší přítomnost chloroplastů ve středním válci v závislosti na stáří kořene, vývoji apoplastických bariér a sklerifikaci buněčných stěn. Pro anatomickou analýzu byla využita různá histochemická barvení a chloroplasty byly lokalizovány v oblasti středního válce pomocí autofluorescence pozorované v epifluorescenčním mikroskopu.

3.2.1 Rostlinný materiál

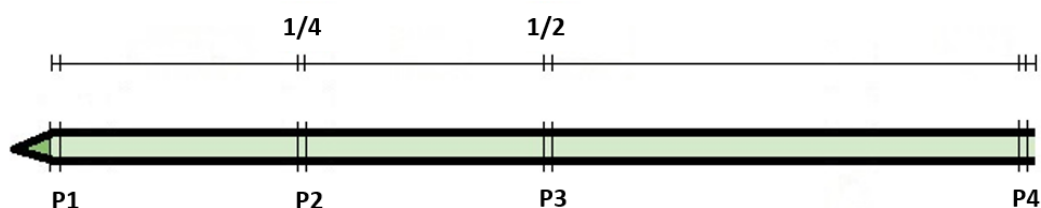
Pro tento experiment byly vybrány 3 modelové druhy epifytických orchidejí – *Neobathia spatulata*, *Acriopsis javanica* a *Vanilla planifolia*. Pro účel anatomické analýzy kořenů byly odebrány vždy 3 kořeny od každého druhu. Bylo tak zajištěno trojí opakování u všech tří druhů. Kořeny druhů *N. spatulata* a *A. javanica* byly odebírány ve sbírkách orchidejí Botanické zahrady hl. m. Prahy na rozdíl od kořenů druhu *V. planifolia* odebraných ve skleníku Katedry experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Při odběru byly preferovány vždy živé, narostlé kořeny o různé délce, nepřiléhající k podkladu (substrátu) a s aktivně rostoucí kořenovou špičkou, obdobně jako v předchozím experimentu. Kořeny byly odebírány celé, a to od špičky až těsně k bázi navazující na prýt.

3.2.2 Anatomická analýza

Pro zmapování postupu diferenciaci pletiv vzdušných kořenů vybraných tří druhů byly využity histochemické metody barvení preparátů. Díky tomu bylo možné vizualizovat jednotlivé buněčné složky v pletivech a také bylo dosaženo vyššího kontrastu preparátu pro lepší pozorování ve světelném mikroskopu. Vybrané metody histochemické detekce umožnily zjistit podrobnější informaci o chemických vlastnostech buněčných stěn (především lignifikaci a suberinizaci). Pro některé druhy barvení a také pro detekci výskytu chloroplastů byla využita i fluorescenční mikroskopie, resp. autofluorescence.

3.2.3 Odběr materiálu a fixace

Z každého kořene byly odebrány segmenty o délce cca 1 cm celkem ve 4 pozicích, aby mohl být analyzován gradient vývoje kořene, respektive postup diferenciacce pletiv od špičky k bázi (Obr. 8). První segment byl odebrán těsně za rostoucí kořenovou špičkou v oblasti, kde se již začíná viditelně odlišovat velamen (P1). Druhý segment byl odebrán v $\frac{1}{4}$ kořene (P2), třetí v $\frac{1}{2}$ (P3) a čtvrtý těsně u báze kořene (P4). Segmenty byly fixovány 4% formaldehydem ve fosfátovém pufru (pH 7,0; 0,1M) a odvodušněny pomocí olejové vývěvy. Doba odvodušňování se vždy vztahovala k tloušťce velamenu. Kořeny s tenkým velamenem (*Vanilla*) byly odvodušňovány 45-60 min, kořeny s tlustým velamenem (*Neobathiea*, *Acriopsis*) byly odvodušňovány 1-1,5 hod. Ze všech segmentů byly následně utvořeny řezy na ručním mikrotomu o síle cca 100-120 μm , na které byly poté aplikovány různé typy histochemického barvení (viz dále). Pro každou pozici bylo ponecháno i několik řezů neobarvených.



Obrázek 8 – Model vzdušného kořene s ukázkou jednotlivých pozic (P1-P4).

3.2.4 Histochemické barvení

3.2.4.1 Sudanová červen

Pro detekci lipidického materiálu buněčných stěn byly řezy barveny lipofilním barvivem Sudan Red 7B (Sigma). Barvicí roztok byl připraven rozpuštěním barviva v PEG400 (0,1% w/v) zahřátím na 90°C a následným smícháním roztoku se stejným objemem 90% glycerolu (Brundrett *et al.*, 1991; Soukup, 2014). Barvení řezů probíhalo při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Z každé pozice (P1-4) byly barveny vždy 2-3 řezy. Po obarvení byly řezy nejprve opláchnuty 1% roztokem detergentu SDS (dodecylsírán sodný; $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) a poté následoval oplach destilovanou vodou a uzavření řezů na podložní sklíčko do 65% glycerolu. Lipofilní barvivo je během procesu barvení absorbováno do lipidického materiálu (Soukup, 2014). Díky omytí detergentem bylo zbytkové neabsorbované barvivo ze vzorku vymyto. Ty části buněčných stěn, které obsahují lipidické složky, byly obarveny tmavě růžově až růžovočerveně (např. suberinové lamely v endodermis a exodermis).

3.2.4.2 Wiesnerova reakce

V pokročilém stádiu vývoje mohou některé buňky ukládat do svých buněčných stěn lignin. U vzdušných kořenů orchidejí byla lignifikace pozorována především ve vývoji vrstev exodermis a endodermis a také při sklerifikaci středního válce (Stern, 2014; Thangavelu & Ayyasamy, 2017). Pro detekci ligninu je z histochemických barvení nejčastěji využívána Wiesnerova reakce, poprvé publikovaná J. Wiesnerem roku 1878. Hlavním principem této reakce je kondenzace floroglucinolu se skořicovými aldehydy ligninu v kyselém prostředí (Pomar *et al.*, 2002; Soukup, 2014).

Připravené řezy byly barveny roztokem okyseleného floroglucinolu (1% floroglucinol rozpuštěný v 18% HCl, w/v) 1-3 minuty při laboratorní teplotě. Z každé pozice byly barveny 2-3 řezy. Po obarvení byly řezy uzavřeny do okyseleného glycerolu (50% glycerol s 5% H₂SO₄). Výsledkem barvení Wiesnerovým činidlem bylo třešňově červené až fuchsiové zbarvení lignifikovaných buněčných stěn, pozorované především u vrstev exodermis, endodermis a u sklerifikovaných buněk středního válce.

3.2.4.3 Berberin

Pro přesnější detekci Casparyho proužků u buněk ve vrstvách exodermis a endodermis bylo využito barvení berberinem s dodatečným dobarvením genciánovou violetí. Berberin je komerčně dostupný fluorochrom využívaný na histochemickou detekci ligninu a suberinu. Obarvené lignifikované i suberinizované buněčné stěny jsou po ozáření UV světlem zbarvené dožluta (Brundrett *et al.*, 1988; Soukup, 2014). Při barvení berberinem je nutné vzorek po obarvení berberinem dobarvit např. toluidinovou modří nebo genciánovou violetí, aby se přebarvila méně specifická vazba a částečně se redukovala silná autofluorescence obarveného materiálu (Brundrett *et al.*, 1988; Soukup, 2014). Tento typ barvení byl využit z důvodu, že se jedná o citlivější a přesnější metodu lokalizace Casparyho proužků, než je jejich detekce floroglucinolem.

Ruční řezy byly barveny roztokem Berberin hemisulfátu (0,5% aq., w/v) 1 hodinu při laboratorní teplotě. V případě, že se v roztoku nacházely krystalky (při skladování berberinu v chladničce dochází postupně ke krystalizaci), byl roztok před použitím zahříván na magnetické míchačce do doby, než se krystalky zcela rozpustily. Po obarvení byly řezy opláchnuty destilovanou vodou a po dobu 10 minut barveny roztokem genciánové violeti

(0,05% aq., w/v). Po dobarvení následoval oplach destilovanou vodou a uzavření řezů do 65% glycerolu.

3.2.5 Snímání

Řezy, které prošly histochemickým barvením, byly pozorovány na mikroskopu Olympus BX51 s CCD kamerou ApogeeAlta U4000 a digitální obraz byl upraven v programu Micro CCD. Vzorke obarvené Sudanovou červení a HCl-floroglucinolem byly snímány ve světelném poli. Vzorke obarvené berberinem byly snímány jako fluorescence po excitaci UV zářením (Olympus U-MWU filter block). Neobarvené řezy byly snímány také jako fluorescence po excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). Při pozorování řezů jsem se zaměřila na zmapování postupu diferenciacce pletiv kořene od špičky k bázi. Konkrétně jsem ve všech pozicích (P1-4) sledovala struktury uvedené v následujících bodech:

- I. apoplastické bariéry – vývojové fáze vrstev endodermis/exodermis
- II. střední válec – tloušťnutí a lignifikace buněčných stěn parenchymatických buněk středního válce

3.2.6 Analýza postupu diferenciacce pletiv

Pro vyhodnocení postupu diferenciacce byl pro každou strukturu zvolen odlišný postup.

3.2.6.1 Endodermis

Všechny výše zmíněné metody histochemické detekce byly využity pro určení aktuálního stádia diferenciacce všech buněk v rámci endodermální vrstvy. Následně byl vybrán řez, na kterém bylo možné přesně spočítat celkový počet buněk endodermis a kvantifikovat množství buněk v určitých stádiích vývoje. U každé buňky vrstvy endodermis tedy bylo stanoveno, v jakém ze tří vývojových stádií se nachází (Tab. 3). V případě, že se endodermální buňky nacházely v terciálním stádiu, byla navíc zaznamenána i informace, jaký tvar má vzniklá ztlustlina (U/O) a zda byla pozorována lignifikace na řezech obarvených HCl-floroglucinolem. U rodu *Vanilla* bylo do tabulky pro účel grafického zobrazení přidáno další stádium, charakterizované jako nejmladší stádium vývoje buňky vrstvy endodermis, kde lze pozorovat pouze primární buněčné stěny bez modifikace (tzn. stádium před vytvořením Casparyho proužků).

počet buněk	pozice			
	P1	P2	P3	P4
celkem				
primární BS bez modifikace				
primární stádium – Casparyho proužky				
sekundární stádium – suberinová lamela				
terciální stádium – sekundární BS				
typ ztlustliny (U/O)				
lignifikace ztlustliny (ANO/NE)				

Tabulka 3 – Experimentální design pro analýzu vývoje vrstvy endodermis kořenů *Vanilla planifolia* ve čtyřech pozicích (P1-P4). BS = buněčná stěna.

Pro tuto analýzu bylo provedeno trojí opakování u všech 3 druhů. Výsledkem této analýzy bylo získání informace, jaký je v každé ze 4 stanovených pozic kořene poměr vývojových stádií endodermálních buněk. Procentuální zastoupení jednotlivých stádií vývoje buněk vrstvy endodermis bylo znázorněno graficky sloupcovými grafy.

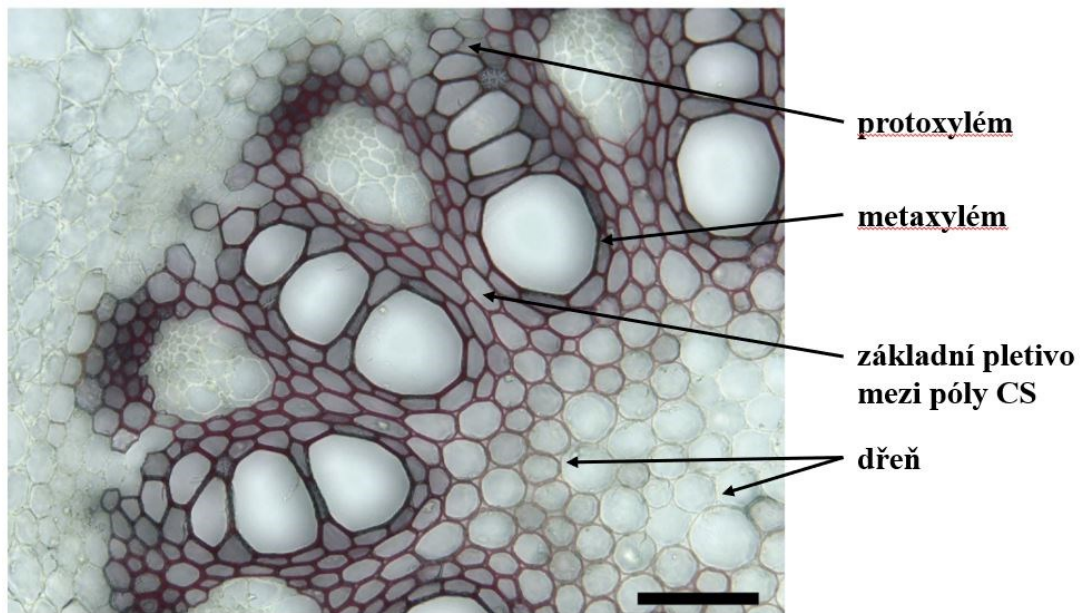
3.2.6.2 Exodermis

V případě vrstvy exodermis nebylo exaktně kvantifikováno množství buněk v určitém stádiu vývoje ani množství propustných buněk. Nejprve byly prohlédnuty řezy ze všech tří provedených histochemických barvení. Jelikož kromě propustných buněk byly všechny buňky exodermis na daném řezu vždy ve stejném stádiu vývoje, bylo pouze zaznamenáno toto stádium. U všech tří druhů tak bylo stanoveno, jaké stádium vývoje buněk vrstvy exodermis v dané pozici kořene převládá. Jednotlivá stádia byla označena jako primární (Casparyho proužky), sekundární (suberinová lamela) a terciální (sekundární buněčné stěny) obdobně jako u vrstvy endodermis. Stejně jako u analýzy buněk vrstvy endodermis bylo i zde provedeno trojí opakování u všech tří druhů.

3.2.6.3 Střední válec

Z důvodu, že se v případě středního válce nejedná pouze o jednu vrstvu buněk, u které lze buňky spočítat a poté určit jejich přesný počet v jednotlivých stádiích vývoje, musel být střední válec charakterizován složitěji. Byly stanoveny čtyři oblasti buněk, ve kterých byly všechny buňky hodnoceny společně (Obr. 9). Zásadní bylo hodnocení dvou oblastí parenchymu středního válce, a to oblasti buněk základního pletiva mezi xylémovými a floémovými póly radiálního cévního svazku (parenchym vodivých pletiv) a oblasti buněk dřene. Kromě těchto

dvou oblastí, byly hodnoceny i oblasti protoxylému a metaxylému. Oblast floému nebyla hodnocena.



Obrázek 9 – Ukázka stanovených oblastí buněk středního válce pro analýzu postupu diferenciaci. Řez kořenem *Vanilla planifolia* v pozici P3. Barvení HCl-floroglucinolem. Tmavě červeně zbarvené lignifikované buněčné stěny. CS = cévní svazek. Měřítko = 100 μm .

Pro potřeby hodnocení byla definována tři stádia vývoje těchto oblastí:

1. stádium: většina buněk v dané oblasti je tenkostěnná, bez lignifikace (primární buněčná stěna)
2. stádium: část buněk je tenkostěnná a část buněk silnostěnná, lignifikace přítomna alespoň u některých buněk
3. stádium: většina buněk je silnostěnná, buněčné stěny jsou lignifikované

Pro tuto analýzu byly pro všechny kořeny využity řezy obarvené HCl-floroglucinolem (detekce ligninu), barvivem Sudan Red a neobarvené řezy. Pro každý kořen byla vytvořena tabulka, do které bylo zaznamenáno stádium vývoje dané oblasti v každé ze 4 pozic (Tabulka 4). Pro grafické znázornění četnosti výskytu jednotlivých stádií v jednotlivých pozicích byly zvoleny tzv. teplotní mapy (ang. *heat maps*).

pozice	oblast	stádium		
		1.	2.	3.
P1	protoxylém			x
	metaxylém		x	
	základní pletivo mezi póly CS	x		
	dřeň	x		
P2	protoxylém			x
	metaxylém			x
	základní pletivo mezi póly CS	x		
	dřeň	x		
P3	protoxylém			x
	metaxylém			x
	základní pletivo mezi póly CS			x
	dřeň			x
P4	protoxylém			x
	metaxylém			x
	základní pletivo mezi póly CS			x
	dřeň			x

Tabulka 4 – Experimentální design pro analýzu postupu diferenciacce středního válce ve čtyřech pozicích (P1-P4). CS = cévní svazek; x = převažující vývojové stádium v dané pozici.

3.2.7 Výskyt chloroplastů

Pro každou pozici na kořenech (P1-P4) byla hodnocena přítomnost chloroplastů ve středním válci, a to na nebarvených řezech díky autofluorescenci chloroplastů při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter) v epifluorescenčním mikroskopu Olympus BX51 (Olympus Optical Co.). Bylo provedeno pouze kvalitativní hodnocení výskytu chloroplastů.

3.2.8 Statistické zpracování dat

Statistická významnost rozdílů v zastoupení buněk vrstvy endodermis v jednotlivých stádiích vývoje mezi různými pozicemi kořenů byla testována zobecněným lineárním modelem s quasibinomickým rozdělením (Nelder & Wedderburn, 1972). Tato metoda byla zvolena proto, že data jsou procentuální a lze tedy předpokládat, že jejich rozdělení bude bližší binomickému než normálnímu. Pozice kořenů, které obsahovaly pouze nulové hodnoty, nebyly zahrnuty do statistické analýzy. Párová porovnání mezi variantami byla provedena pomocí metody Tukey (Tukey, 1949). Hladina průkaznosti byla ve všech případech 5 %. Analýzy byly provedeny v programu R 3.6.1 (R Core Team, 2019) s využitím balíčku *multcomp* (Hothorn *et al.*, 2008). Ostatní získaná data neumožňují smysluplné statistické zhodnocení.

3.3 Ultrastruktura chloroplastů

Z důvodu, že dosud neexistují práce, které by se zabývaly detailním hodnocením chloroplastů v jednotlivých částech kořenů epifytických orchidejí, je tento experiment prvním hrubým náhledem do dané problematiky. Ultrastruktura chloroplastů z oblastí primární kůry a středního válce byla hodnocena pouze kvalitativně, nicméně na základě většího množství snímků chloroplastů z obou oblastí. Kvantitativní hodnocení zastoupení jednotlivých vnitřních struktur chloroplastů nebylo prováděno.

3.3.1 Pozorování pomocí transmisního elektronového mikroskopu

Využití transmisního elektronového mikroskopu (TEM) je další využitou mikroskopickou technikou, která výrazně pomohla lokalizovat chloroplasty. Vyšší efektivní zvětšení umožnilo pozorování ultrastruktury chloroplastů a dalších plastidů a zároveň i pozorování stavby buněčných stěn buněk ve středním válci, což umožnilo získat detailnější informace k postupu diferenciaci.

Pro tento experiment bylo vybráno 13 druhů z podčeledi *Epidendroideae* a jeden druh podčeledi *Vanilloideae* – *Vanilla planifolia*, celkem 14 druhů uvedených v Tab. 2 (kap. 3.1.1.) (ostatní dva druhy rodu *Vanilla* z téže tabulky nebyly analyzovány). Na všech vybraných druzích již byla provedena analýza lokalizace chloroplastů pomocí autofluorescence v oblastech primární kůry a středního válce (viz kap. 3.1.). Z čerstvě odebraných kořenů byly vždy v ½ kořene, tj. v pozici P3 odebrány 2mm segmenty, které byly následně rozpůleny pro snazší vstup fixáže a zafixovány 2,5% GA (glutaraldehyd) v kakodylátovém pufru (0,1M). Kakodylátový pufr byl připraven z 21,4 g kakodylanu sodného rozpuštěného v 500 ml vody a pH bylo upraveno na hodnotu 7,0. Poté bylo 50 ml tohoto roztoku smícháno s 50 ml glukosy (2,7 g v 50 ml).

Vzorky byly v Laboratoři elektronové mikroskopie Univerzity Karlovy zpracovány pro TEM následujícím způsobem. Po fixaci následoval oplach kakodylátovým pufrům (0,1M), postfixace oxidem osmičelým (2% OsO₄ v 0,1M kakodylátovém pufru) a oplach destilovanou vodou. Dále byla provedena dehydratace vzorků ethanolovou řadou - 35, 50, 70, 80, 96 a 2x 100% ethanol. Každý krok trval 20 min. Následovala další dehydratace 100% acetonem (3x 5 min) a po odvodnění pletiv byly vzorky pozvolně infiltrovány epoxidovou pryskyřicí Spurr – 10, 25, 50, 75% (2 hod na každý krok). Vzorky byly zality do formy, polymerovány v termostatu po dobu 48 hodin (65 °C) a následně z nich byly připraveny řezy (70 nm)

na ultramikrotomu. Následovalo kontrastování ultratenkých řezů octanem uranylu (2-3% aq., tma, 20 min – 1 hod, ethanolová atmosféra) a citrátem olovnatým (Reynolds (1963); 20 min, atmosféra bez CO₂). Snímky byly pořízeny CCD kamerou Veleta s aktivizačním softwarem Olympus (Olympus Soft Imaging Solution GmbH) na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 v Laboratoři elektronové mikroskopie Univerzity Karlovy.

3.3.2 Metody hodnocení

Bylo provedeno kvalitativní hodnocení chloroplastů z oblastí středního válce a primární kůry. Nasnímáno bylo u každého druhu pět chloroplastů ze středního válce a stejný počet z primární kůry. Zaznamenány byly vždy nápadné odlišnosti v ultrastruktuře, především množství přitištěných/nepřitištěných thylakoidů, přítomnost plastoglobulů a přítomnost, velikost a množství škrobových zrn na řezech. Pro jednoduché znázornění rozdílů byly vytvořeny kategorie pro každý hodnocený znak. V případě gran bylo pozorováno nápadně vysoké nebo nízké množství přitištěných thylakoidů na řezu a grana byla popsána jako masivní nebo tenká. V případě plastoglobulů byla monitorována pouze jejich přítomnost v chloroplastech. Škrobová zrna byla popsána jako malá, velká a masivní. Jako malá škrobová zrna byla považována ta, která na řezu nezabírala velkou část chloroplastu. Naopak velká škrobová zrna na řezu často zasahovala od jednoho konce chloroplastu k druhému. Jako masivní byla považována škrobová zrna, která vyplňovala téměř celou oblast plastidu na řezu. V případě těchto masivních zrn nebylo možné s jistotou určit, zda se jedná o chloroplast či jiný druh plastidu. V těchto případech také nemohla být jednoznačně charakterizována grana. U druhu *V. planifolia* byly z důvodu nejasné lokalizace chloroplastů v předchozím experimentu pouze pomocí autofluorescence prohlédnuty řezy ze tří kořenů. U ostatních 12 druhů byly prohlédnuty řezy vždy z jednoho kořene.

3.4 Imunolokalizace enzymu PEP-karboxyláza

V tomto experimentu bylo cílem lokalizovat enzym PEP-karboxylázu v jednotlivých oblastech kořenů vybraných orchidejí pomocí imunohistochemické detekce. Pro tuto detekci bylo nejprve nutné optimalizovat metodiku, a to z důvodu, že imunolokalizace fotosyntetických enzymů dosud nebyla na kořenech orchidejí provedena. Zvolená metodika měla základ v ověřené metodice pro imunodetekci kalózy v práci Soukup (2014). Modifikovaná byla dále podle metodiky imunolokalizace PEP-karboxylázy v pracích Voznesenskaya *et al.* (2008) a Aivalakis *et al.* (2004).

Pro imunodetekci byla použita komerčně dodávaná primární protilátka s odpovídající sekundární protilátkou (Tab. 5). Jako pozitivní kontrola pro imunodetekci PEP-karboxylázy sloužila kukuřice (*Zea mays*), u které byla firmou Agrisera potvrzena reaktivita primární protilátky. Imunolokalizace PEP-karboxylázy byla provedena u dvou druhů orchidejí – *Neobathiea spatulata* a *Acriopsis javanica*. Dopady modifikací postupu imunolokalizace jsou uvedeny ve výsledcích. Postup imunodetekce po optimalizaci metody byl následující.

	Specifikace	Klonalita	Zvíře	Firma, kód	Použité ředění
Primární protilátka	anti-PEPC	polyklonální	králík	Agrisera, AS09458	1:100
Sekundární protilátka	Goat anti-Rabbit IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated	polyklonální	koza	Agrisera, AS09633	1:1000

Tabulka 5 – Protilátky použité při imunolokalizaci enzymu PEP-karboxyláza (PEPC) u druhů *Zea mays*, *Neobathiea spatulata* a *Acriopsis javanica*.

3.4.1 Příprava zásobních roztoků protilátek

Zásobní roztok primární protilátky byl připraven dle protokolu výrobce (Agrisera). Nejprve byla připravena MiliQ voda o pH 7,4 (pro zvýšení pH byl použit 2M roztok KOH). V laminárním boxu (ang. *flowbox*) byla voda přefiltrována stříkačkou přes sterilní filtr s 0,2 µm otvory do sterilních Eppendorfových zkumavek. Ve 100 µl takto upravené vody byla poté rozpuštěna lyofilizovaná primární protilátka, čímž byl připraven zásobní roztok o ředění 1:1, který byl následně skladován při -20 °C. Těsně před aplikací protilátky na vzorky byl zásobní roztok ředěn PBS (fosfátový pufr s NaCl; pH 7,3) s BSA (hovězí sérový albumin, 10% w/v) do požadovaného finálního ředění (1:100). PBS použitý při imunolokalizaci byl připraven z 80,1 g NaCl, 2 g KCl, 14,7 g Na₂HPO₄·2H₂O, 2,38 g KH₂PO₄ a roztok byl zředěn 10x na výsledný pufr o pH 7,3.

Zásobní roztok sekundární protilátky byl připraven dle protokolu výrobce (Agrisera), skladován při -20 °C a těsně před použitím ředěn pomocí PBS do požadovaného ředění 1:1000 (viz dále).

3.4.2 Postup imunolokalizace PEP – karboxylázy

Z čerstvě odebraných kořenů orchidejí *N. spatulata* a *A. javanica* byl odebrán segment v ½ kořene. Ze 7-denní hydroponicky napěstované kukuřice byl odebrán segment přibližně

v ½ listu. Odebrané segmenty byly fixovány 4% formaldehydem ve fosfátovém pufru (pH 7,0; 0,1M) celkem 2 hodiny. Během fixace proběhlo odvodušení pomocí olejové vývěvy. Ze segmentů byly utvořeny řezy na ručním mikrotomu o síle cca 100-120 μm. Řezy byly následně přemístěny v nylonových sítkách na plotnu s jamkami a 2x opláchnuty PBS (pH 7,3) vždy 2 minuty. Po odsátí pufru z jamek byly řezy umístěny do roztoku pro permeaci membrán, kdy byl využit detergent Tween-20 (0,1%, v/v) podobně jako v pracích Voznesenskaya *et al.* (2008) a Aivalakis *et al.* (2004) (Tab. 6). Permeace probíhala při pokojové teplotě 1 hod. Po odsátí permeačního roztoku byl do jamek pipetován roztok kaseinu pro potlačení nespecifické vazby protilátky (1,5% kasein v PBS). Po 15 minutách proběhl znovu dvouminutový oplach řezů v PBS. Následně byl do jamek pipetován připravený roztok s primární protilátkou (Tab. 6). Do jamek s negativní kontrolou byl pipetován pouze roztok PBS s BSA bez primární protilátky. Plotna s jamkami byla umístěna do velké Petriho misky s mokrým ubrouskem vespod a přiklopena další miskou. Vznikla tak vlhká komůrka, která byla umístěna do tmy a ponechána při pokojové teplotě 4 hodiny.

	Použité množství	Složení
Permeační roztok	2 ml	900 μl PBS + 100 μl BSA* + 1μl Tween 20
Roztok primární protilátky	2 ml	1980 μl PBS + 20 μl BSA* + 10 μl anti-PEPC
Roztok sekundární protilátky	2 ml	1996 μl PBS + 20 μl BSA* + 2 μl anti-Rabbit IgG

Tabulka 6 – Složení roztoků použitých při imunolokalizaci PEP-karboxylázy. * Zásobní roztok BSA (10% w/v).

Následně byly řezy opláchnuty 2x 10 min v PBS a po odsátí byl do jamek pipetován roztok sekundární protilátky (Tab. 6). Na noc byla vlhká komůrka se vzorky umístěna do lednice do tmy. Další den následoval znovu oplach 2x 10 min v PBS a řezy byly poté dobarveny roztokem genciánové violeti (0,05% aq., w/v) vždy 1-1,5 min. Po dobarvení byly řezy znovu opláchnuty na několik sekund v PBS a uzavřeny do 65% glycerolu. Řezy byly pozorovány a snímány při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filtr) na mikroskopu Olympus BX51 s CCD kamerou ApogeeAlta U4000. Obraz byl upraven v programu Micro CCD.

4 Výsledky

4.1 Analýza lokalizace chloroplastů v kořenech pomocí autofluorescence

V tomto experimentu byl zdokumentován výskyt chloroplastů ve středním válci kořenů celkem 16 druhů epifytických orchidejí ze dvou podčeledí – *Epidendroideae* a *Vanilloideae*. Z důvodu značné odlišnosti obou podčeledí budou výsledky prezentovány ve dvou podkapitolách.

4.1.1 Podčeleď *Epidendroideae*

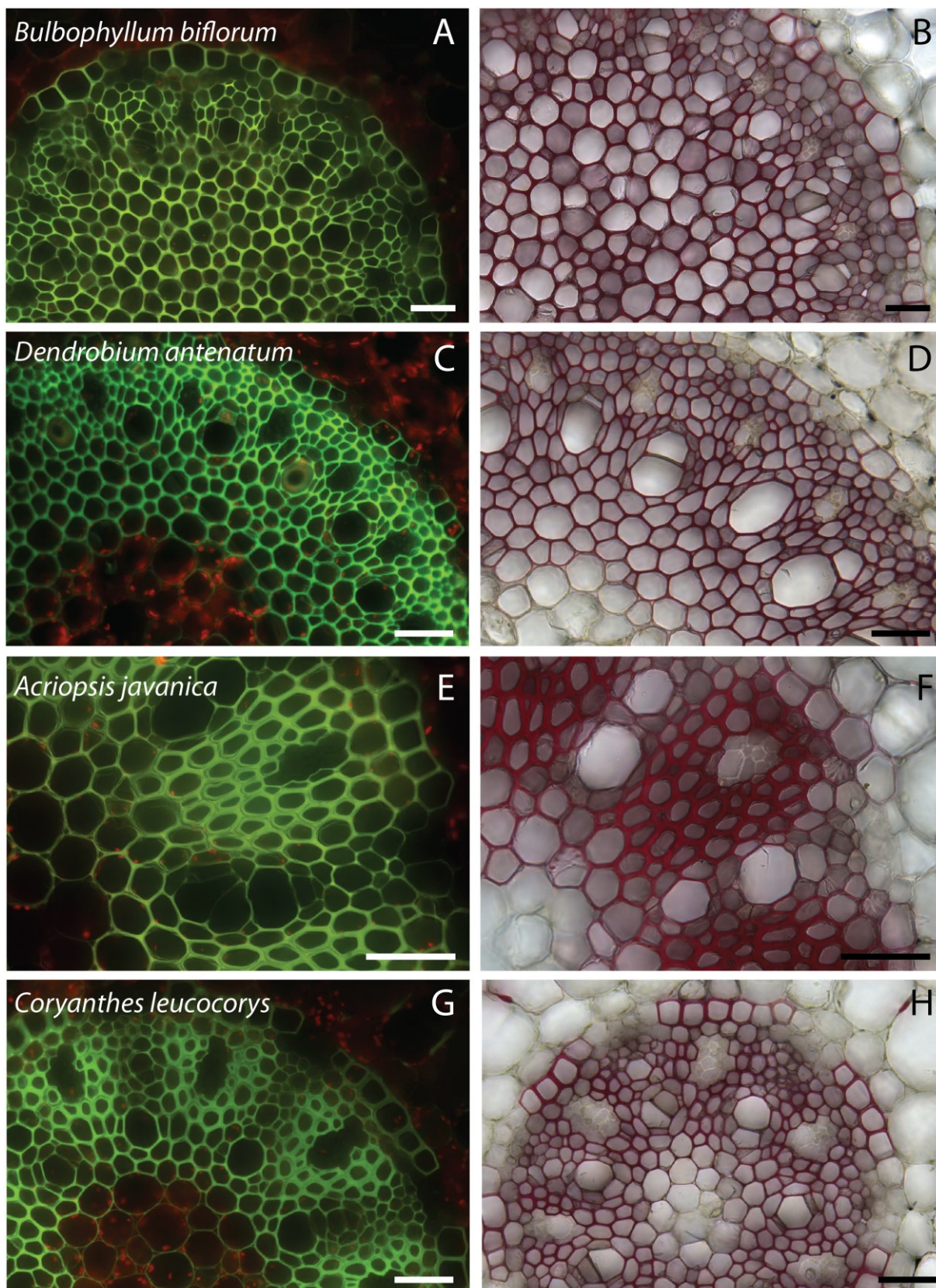
U všech pozorovaných druhů z Tabulky 7 (pouze s výjimkou *Bulbophyllum biflorum* a *Porroglossum lorenae*) byly chloroplasty pozorovány v primární kůře i ve středním válci (Obr. 10, 11, 12 a 13). Ve středním válci byly pozorovány jak v oblasti dřene, tak v oblasti okolo xylémových a floémových pólů radiálního cévního svazku (Tab. 7). U druhu *B. biflorum* byl nejednoznačný výskyt chloroplastů v buňkách okolo xylémových a floémových pólů cévního svazku z důvodu silné autofluorescence lignifikovaných buněčných stěn. U druhu *P. lorenae* byla autofluorescence velice silných buněčných stěn celého středního válce tak vysoká, že nebylo možné určit výskyt chloroplastů ani v jedné z hodnocených oblastí.

Druhy z <i>Epidendroideae</i>	Dřeň	Základní pletivo mezi póly CS
<i>Bulbophyllum biflorum</i>	ANO	nejednoznačné
<i>Dendrobium antennatum</i>	ANO	ANO
<i>Acriopsis javanica</i>	ANO	ANO
<i>Coryanthes leucocorys</i>	ANO	ANO
<i>Dinema polybulbon</i>	ANO	ANO
<i>Andinia longiserpens</i>	ANO	ANO
<i>Porroglossum lorenae</i>	nejednoznačné	nejednoznačné
<i>Eria hyacinthoides</i>	ANO	ANO
<i>Angraecum praestans</i>	ANO	ANO
<i>Dendrophylax funalis</i>	ANO	ANO
<i>Neobathiea spatulata</i>	ANO	ANO
<i>Cleisostoma yersinii</i>	ANO	ANO
<i>Taeniophyllum pusillum</i>	ANO	ANO

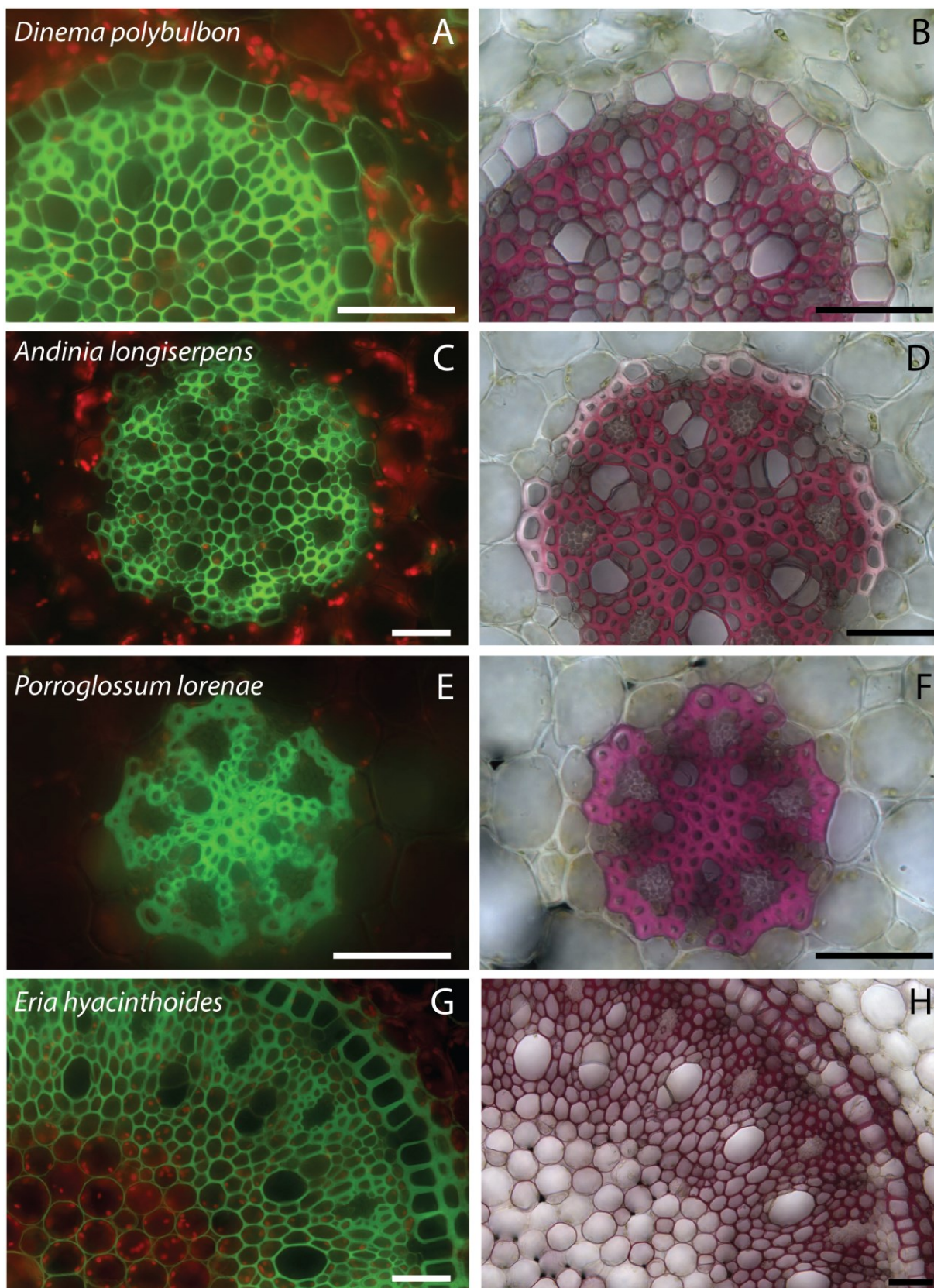
Tabulka 7 – Výskyt chloroplastů ve dvou oblastech středního válce kořenů orchidejí z podčeledi *Epidendroideae*. CS = cévní svazek.

Střední válec všech pozorovaných druhů byl v této pozici kořene (P3 = ½ kořene) již silně lignifikovaný a částečně sklerifikovaný, což bylo dobře patrné z řezů barvených HCl-fluoroglucinolem (např. Obr. 11B, 11D, 11F). Na všech neobarvených řezech byla pozorována

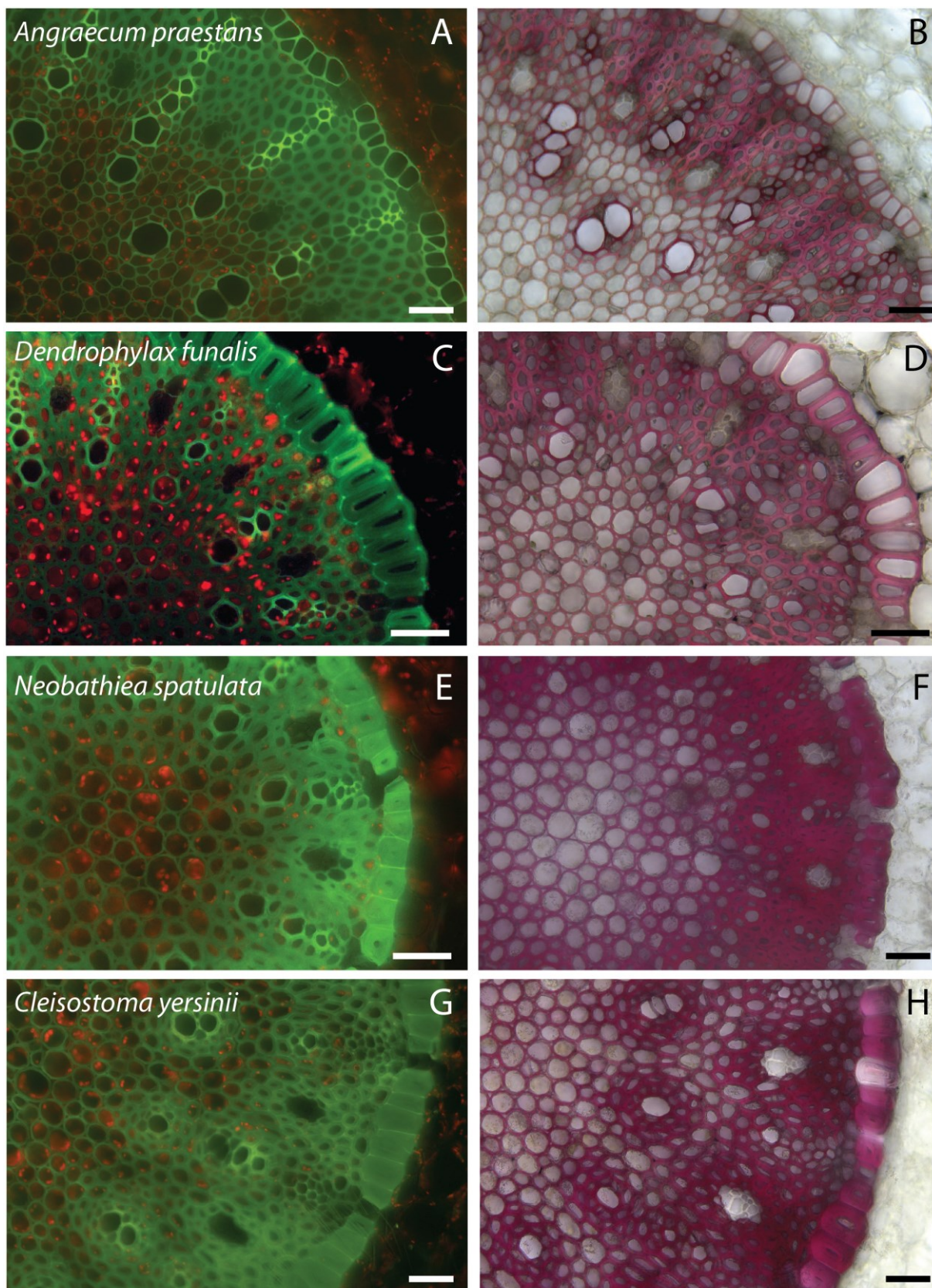
silná autofluorescence lignifikovaných buněčných stěn (např. Obr. 11A, 11C, 11E, 11G). U druhů *B. biflorum*, *P. lorerenae*, a *T. pusillum* se tloušťka buněčných stěn buněk dřene a buněk mezi póly cévního svazku lišila velmi málo. U ostatních druhů měly buňky mezi póly cévního svazku vždy silnější buněčné stěny oproti buňkám dřene. U druhů *D. antennatum* (Obr. 10C). a *A. javanica* (Obr. 10E, 10F) nebyly buňky uprostřed dřene lignifikované.



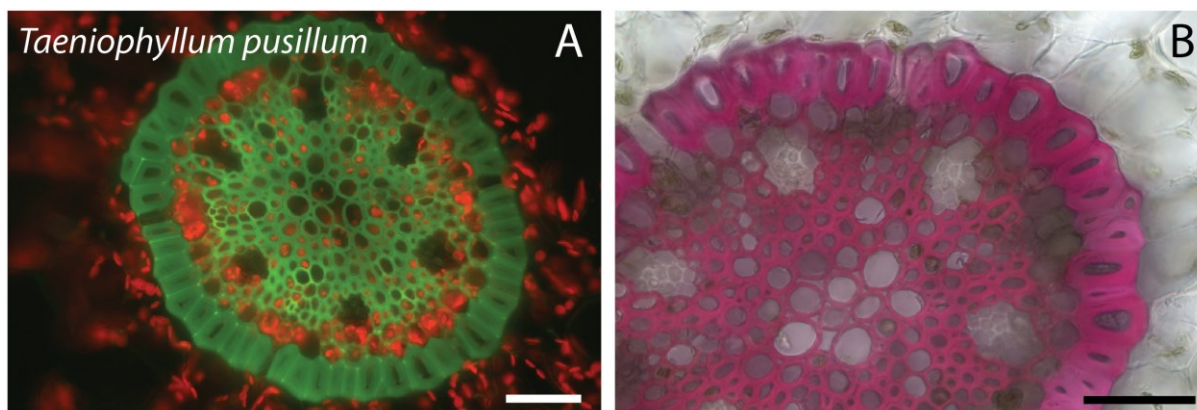
Obrázek 10 – Lokalizace chloroplastů ve středním válci kořenů druhů *B. biflorum* (A, B), *D. antennatum* (C, D), *A. javanica* (E, F) a *C. leucocorys* (G, H). Na levé straně snímky nebarvených řezů pozorovaných při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). Na pravé straně snímky řezů obarvených HCl-fluoroglucinolem a snímaných ve světlem poli. Měřítka = 50 μ m.



Obrázek 11 – Lokalizace chloroplastů ve středním válci kořenů druhů *D. polybulbon* (A, B), *A. longiserpens* (C, D), *P. lorenae* (E, F) a *E. hyacinthoides* (G, H). Na levé straně snímky nebarvených řezů pozorovaných při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). Na pravé straně snímky řezů obarvených HCl-fluoroglucinem a snímaných ve světlém poli. Měřítko = 50 μ m.



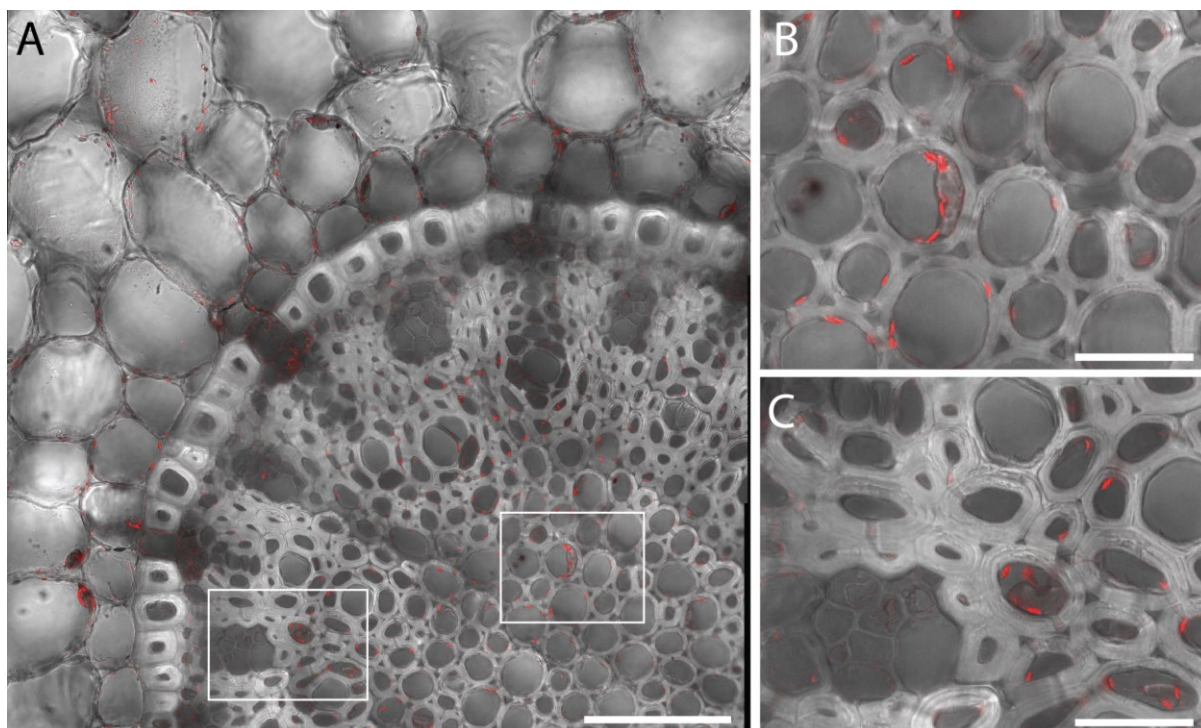
Obrázek 12 – Lokalizace chloroplastů ve středním válci kořenů druhů *A. praestans* (A, B), *D. funalis* (C, D), *N. spatulata* (E, F) a *C. yersinii* (G, H). Na levé straně snímky nebarvených řezů pozorovaných při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). Na pravé straně snímky řezů obarvených HCl-floroglucinolem a snímaných ve světlém poli. Měřítko = 50 μ m.



Obrázek 13 – Lokalizace chloroplastů ve středním válci kořenů druhu *T. pusillum*. (A) - Snímek nebarveného řezu pozorovaného při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). (B) - Snímek řezu obarveného HCl-fluoroglucinolem snímaného ve světlém poli. Měřítko = 50 µm.

4.1.1.1 Ověření přítomnosti chloroplastů ve středním válci pomocí konfokálního mikroskopu

Díky pozorování pomocí konfokálního mikroskopu byla potvrzena přítomnost chloroplastů v silnostěnných buňkách středního válce, a to u vybraného modelového druhu *Neobathiea spatulata* z podčeledi *Epidendroideae*. Z obrázku 14 je patrné, že se v pozici P4 (kořenová báze) v oblasti základního pletiva mezi xylémovými a floémovými póly radiálního cévního svazku vyskytují buňky s velice silnými sekundárními buněčnými stěnami. Naopak v oblasti dřene jsou sekundární buněčné stěny o něco tenčí. Jak v první oblasti, tak ve druhé, jsou ale v silnostěnných buňkách jasně viditelné chloroplasty (Obr. 14B, 14C). Endodermis je v této části kořene v terciálním stádiu vývoje a tvoří silné O-ztlustliny. Propustné buňky setrvávají v mladším stádiu. V propustných buňkách endodermis a několika buňkách pericyklu v blízkosti těchto propustných buněk byl pozorovaný signál podobný signálu z chloroplastů (shodné emisní spektrum). Nejednalo se ale o jednoznačně rozeznatelné chloroplasty, které byly pozorovány v okolí.



Obrázek 14 – Lokalizace chloroplastů u modelové orchideje *N. spatulata* v pozici P4 (kořenová báze). (A) – Střední válec a část primární kůry. Měřítko = 100 μm . Emisní spektrum chloroplastů bylo nastaveno podle λ scanu na 650-750 nm (červená barva). Bílé obdélníky ukazují oblasti detailů B a C. (B) – Detail výskytu chloroplastů v oblasti dřene. Měřítko = 30 μm . (C) – Detail výskytu chloroplastů v oblasti silnostěnných buněk základního pletiva u oblasti floému. Měřítko = 30 μm .

4.1.2 Podčeleď *Vanilloideae*

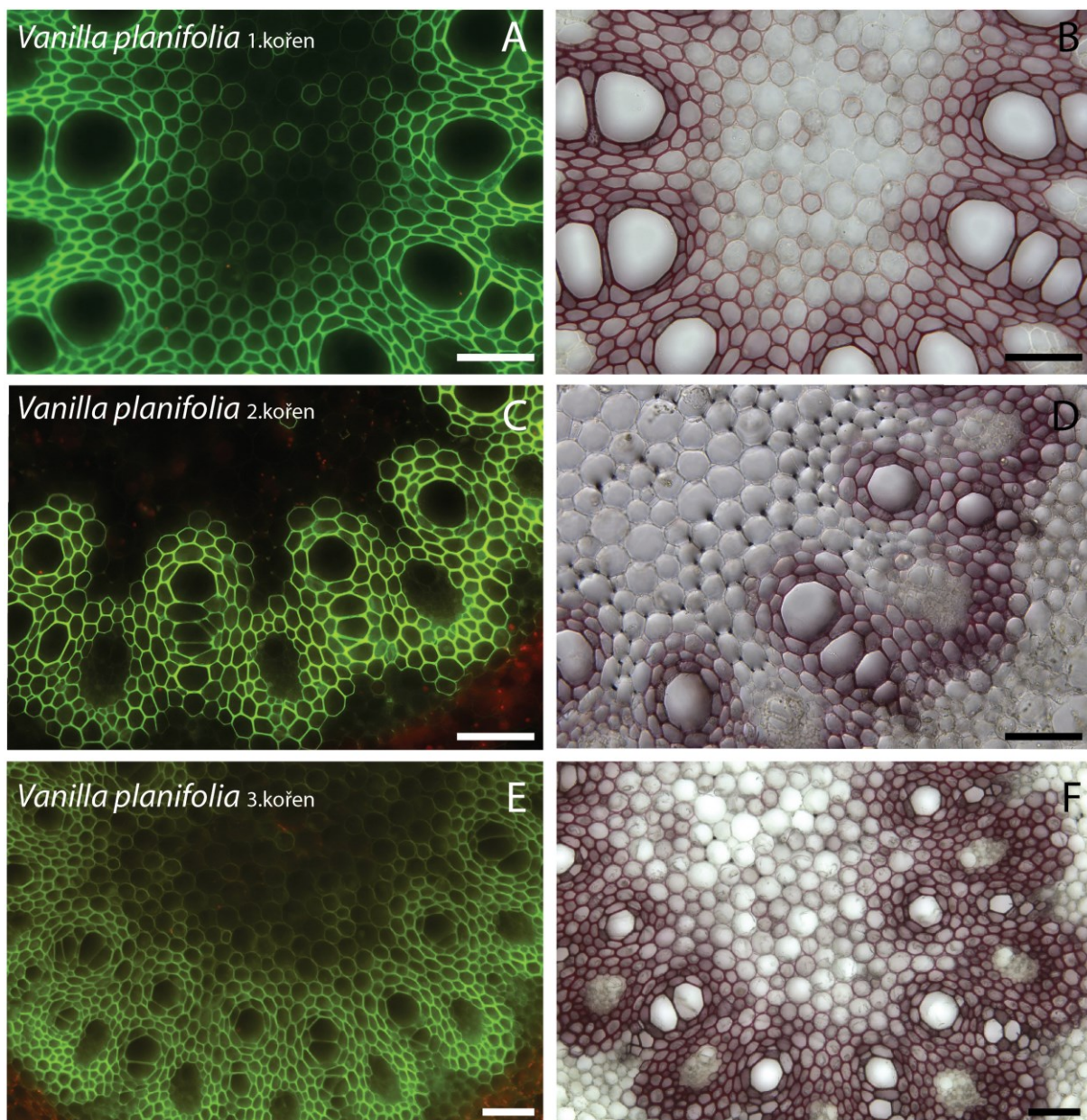
Z podčeledi *Vanilloideae* byly pro tento experiment vybrány 3 druhy – *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona* a *Vanilla madagascariensis*. Z důvodu, že na řezech z prvního prohlédnutého kořene druhu *V. planifolia* nebyly pozorovány žádné chloroplasty v oblasti středního válce, byly u tohoto druhu prohlédnuty ještě další dva odebrané kořeny, tzn. nebarvené řezy ze stejné pozice P3 (½ kořene). Tyto odebrané kořeny byly v té době připraveny pro pozorování postupu diferenciaci kořene popsané v kapitole 4.2.3. Ve druhém analyzovaném kořeni *V. planifolia* bylo pozorováno ve dřeni větší množství chloroplastů, naopak ve třetím kořeni bylo pozorováno pouze velmi malé množství chloroplastů, a to pouze ve střední části dřene (Tab. 8; Obr. 15).

U druhu *V. pompona* byly pozorovány chloroplasty v oblasti dřene, na rozdíl od druhu *V. madagascariensis*, kde byl pozorován celý střední válec zcela bez chloroplastů (Obr. 16).

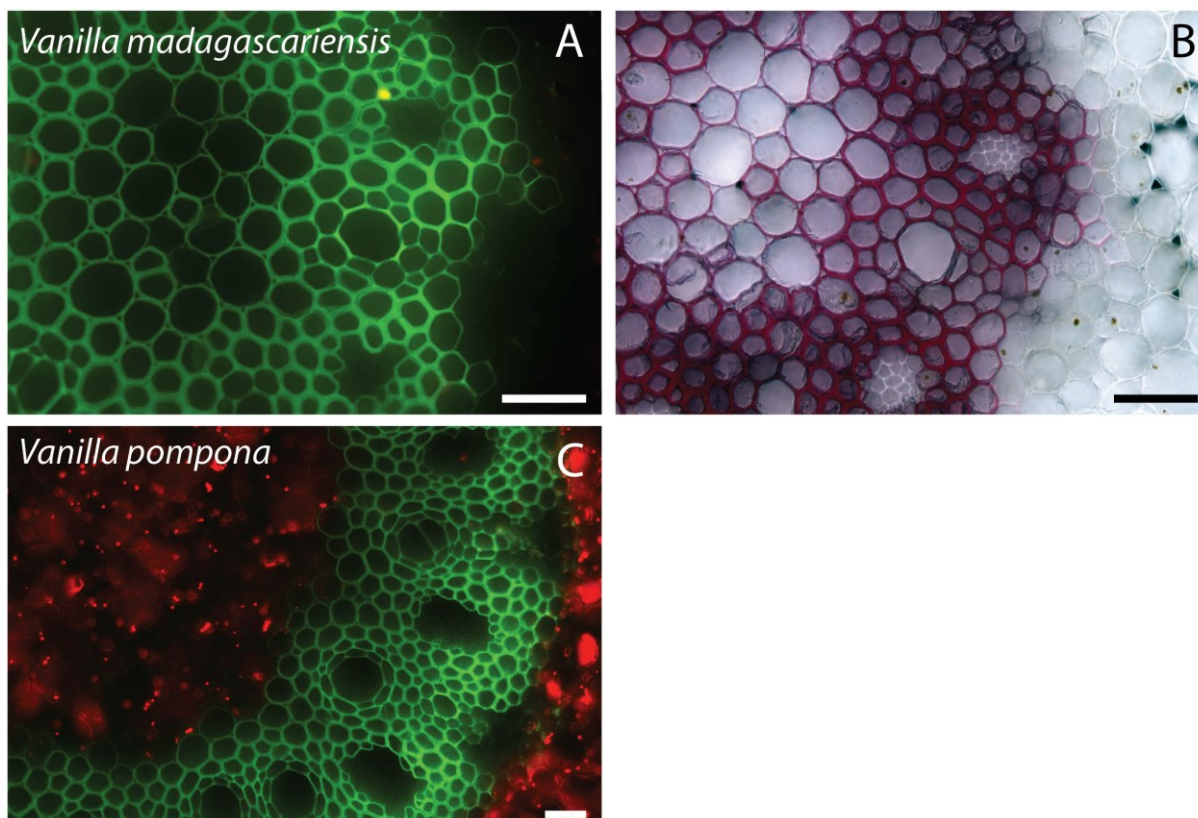
Druhy z <i>Vanilloideae</i>		Dřeň	Základní pletivo mezi póly CS
<i>Vanilla planifolia</i>	1.kořen	NE	NE
	2.kořen	ANO	NE
	3.kořen	ANO	NE
<i>Vanilla pompona</i>		ANO	NE
<i>Vanilla madagascariensis</i>		NE	NE

Tabulka 8 - Výskyt chloroplastů ve dvou oblastech středního válce kořenů orchidejí z podčeledi *Vanilloideae*.
CS = cévní svazek.

Buněčné stěny buněk základního pletiva okolo xylémových a floémových pólů na řezech obarvených HCl-fluoroglucinolem byly u *V. planifolia* a *V. madagascariensis* tmavě růžové, což odpovídá depozici ligninu (Obr. 15, 16). U druhu *V. pompona* se toto barvení nepodařilo. Autofluorescence těchto buněčných stěn značně ovlivňovala pozorování výskytu chloroplastů v této oblasti. U prvního i třetího kořene druhu *V. planifolia* byla dřeň lignifikovaná celá na rozdíl od druhého kořene, ve kterém zatím k lignifikaci buněčných stěn buněk dřeně nedošlo. U buněk dřeně *V. planifolia* a *V. madagascariensis* bylo zbarvení lignifikovaných buněčných stěn jemnější, a ne u všech buněk. U druhu *V. pompona* byla téměř celá dřeň pravděpodobně nelignifikovaná (Obr. 16C).



Obrázek 15 - Lokalizace chloroplastů ve středním válci tří kořenů druhu *V. planifolia*. Na levé straně snímky nebarvených řezů pozorovaných při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter) (A, C, E). Na pravé straně snímky řezů obarvených HCl-fluoroglucinem a snímaných ve světlém poli (B, D, F). Měřítko = 100 μ m.



Obrázek 16 – Lokalizace chloroplastů ve středním válci druhů *V. madagascariensis* (A, B) a *V. pompona* (C). Na levé straně snímky nebarvených řezů pozorovaných při excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter) (A, C). Na pravé straně snímek řezu obarveného HCl-fluoroglucinolem a snímaného ve světlém poli (B). Měřítko = 50 μm .

4.2 Závislost výskytu chloroplastů ve středním válci na postupu diferenciaci kořene

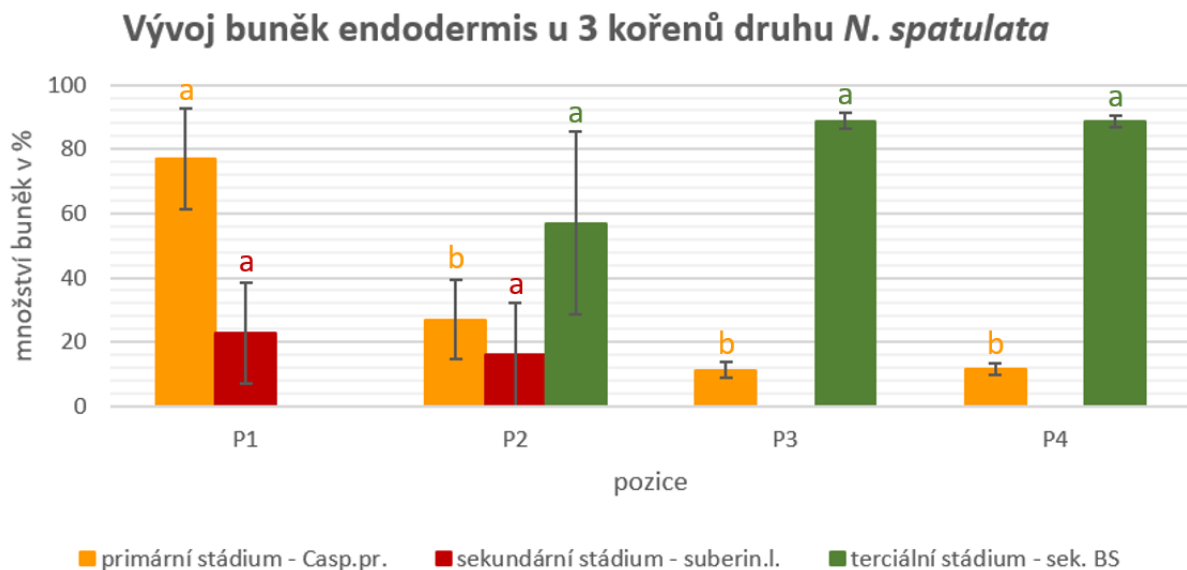
4.2.1 *Neobathiea spatulata*

Odebrané tři kořeny pro tento druh se lišily ve svých délkách, které byly 24 cm, 34 cm a 33 cm.

4.2.1.1 Endodermis

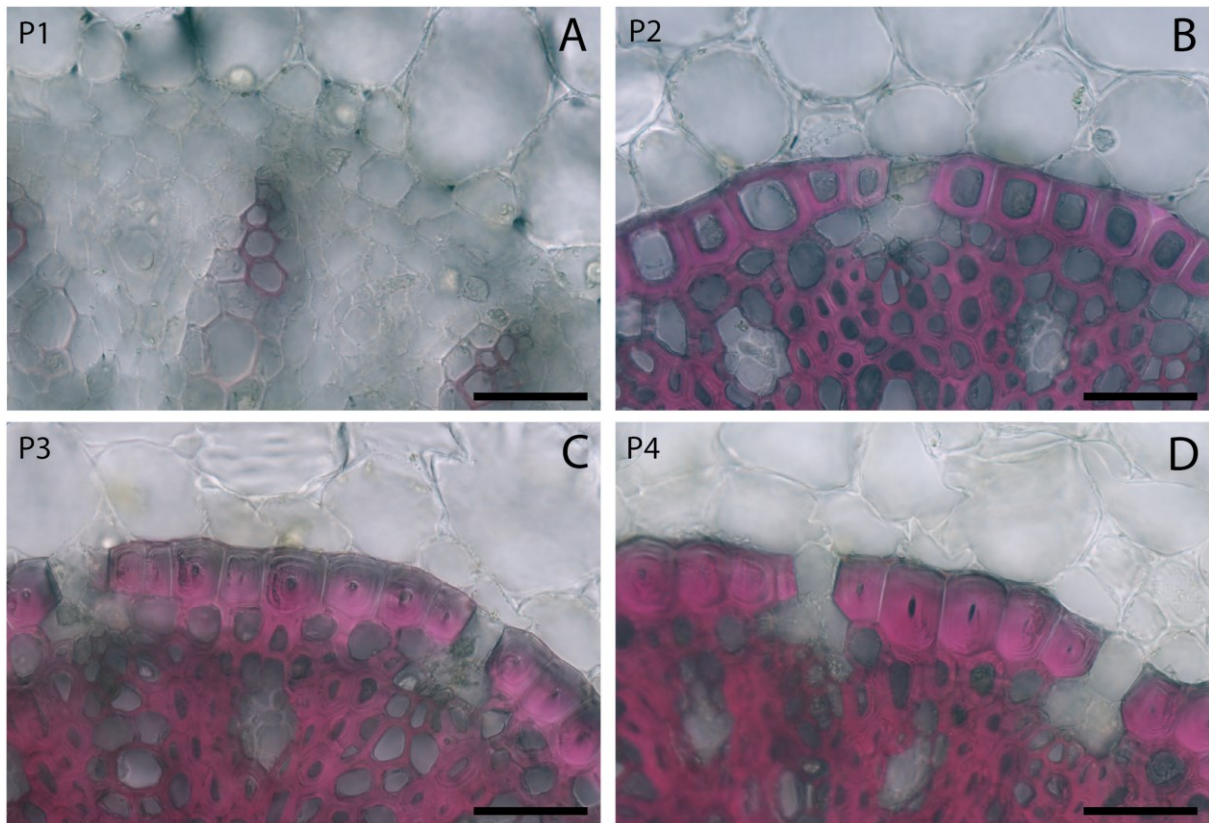
Na grafu 3 je znázorněno průměrné procentuální zastoupení buněk v daných stádiích vývoje endodermis ve čtyřech pozicích podél podélné osy kořene. Množství buněk v primárním a sekundárním stádiu postupně od špičky k bázi kořene klesá, naopak buněk v terciálním stádiu vývoje značně přibývá. Buňky setrvávající v primárním stádiu byly tzv. propustné buňky a okolní buňky téže vrstvy všechny prošly přes sekundární až do terciálního stádia (Obr. 17, 18). Jednotlivé kořeny ze tří opakování se lišily výrazněji pouze v pozici P1 a P2. U prvního kořene v pozici P1 byly všechny buňky v primárním stádiu, na rozdíl od kořenů 2 a 3, kde měly v této pozici již některé buňky vyvinutou suberinovou lamelu. V pozici P2 nebyly u kořene 1

přítomny buňky se sekundární buněčnou stěnou, na rozdíl od kořenů 2 a 3, kde už byly přítomny pouze buňky v primárním a terciálním stádiu. V pozicích P3 a P4 se poměr buněk v primárním a terciálním stádiu u všech tří kořenů už téměř zcela shodoval. Rozdíly v zastoupení buněk v primárním stádiu mezi pozicemi byly statisticky významné ($X^2_{[3,8]} = 4.1$; $P \leq 2.7 \times 10^{-5}$). Rozdíl v zastoupení buněk v sekundárním stádiu mezi pozicemi P1-P2 nebyl statisticky významný ($X^2_{[1,4]} = 0.05$; $P \leq 0.77$). Rozdíly v zastoupení buněk v terciálním stádiu mezi pozicemi P2-P4 nebyly statisticky významné ($X^2_{[2,6]} = 1.1$; $P \leq 0.19$).

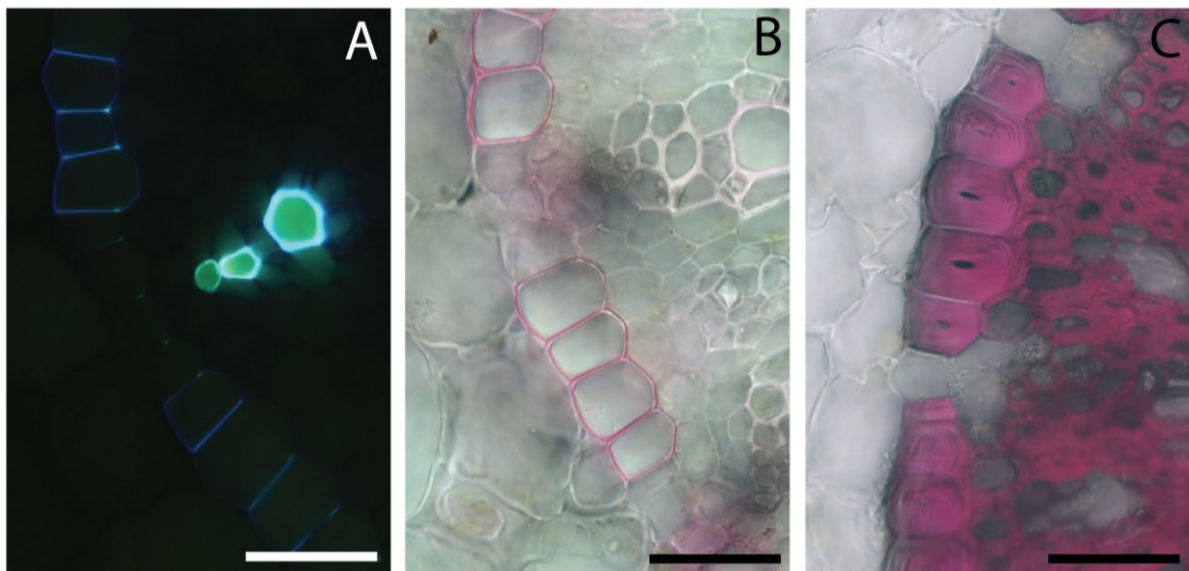


Graf 3 – Procentuální zastoupení buněk vrstvy endodermis ve třech stádiích vývoje vždy pro čtyři pozice kořene (průměr pro 3 kořeny) druhu *N. spatulata*. Chybové úsečky v grafu ukazují střední chybu průměru. Rozdíly mezi zastoupením buněk mezi pozicemi byly statisticky hodnoceny pro každé stádium odděleně. Písmena nad sloupci ukazují statisticky významné rozdíly a jejich barva odpovídá skupině dat, ke které se vztahují.

Na řezech z prvního kořene z pozice P1 barvených berberinem byl jasně viditelný opožděný vývoj endodermálních buněk naproti xylémovému pólu (Obr. 18A). U všech třech kořenů byla také pozorována zvyšující se tloušťka sekundárních buněčných stěn ve vzdálenějších pozicích od kořenové špičky a s tím související značné zmenšování prostoru protoplastu endodermálních buněk (Obr. 18C). Typ ztlustliny byl u všech tří kořenů charakterizován jako O-ztlustlina, kdy byla pozorována rovnoměrně uložená sekundární buněčná stěna na všech stranách endodermálních buněk. Řezy obarvené HCl-floroglucinolem ukázaly tmavě růžové zbarvení lignifikovaných sekundárních buněčných stěn (Obr. 17).



Obrázek 17 – Postup diferenciace buněk endodermis *N. spatulata* od pozice P1 k P4. Řezy obarveny HCl-floroglucinolem a snímány ve světelném poli. Růžové zbarvení lignifikovaných buněčných stěn. (B, C, D) Terciální stádium – lignifikované O-ztlustliny. Měřitko = 50 μm .



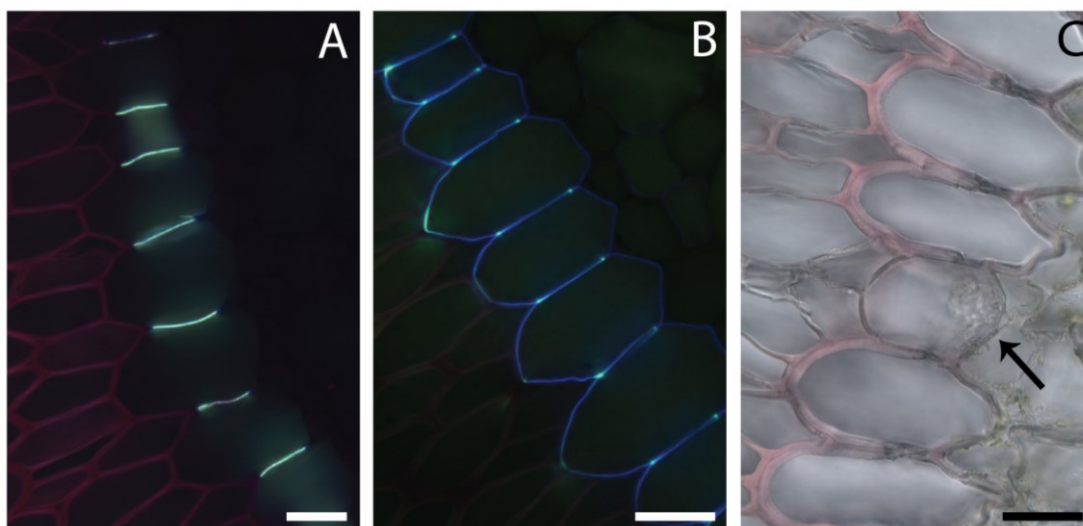
Obrázek 18 – Stádia vývoje buněk endodermis u druhu *N. spatulata*. (A) Primární stádium – Casparyho proužky. Barveno berberinem a snímáno jako fluorescence po excitaci UV zářením (Olympus U-MWU filter block). (B) Suberinové lamely (červená linka) – sekundární stádium. Barveno barvivem Sudan Red 7B (Sigma) a snímáno ve světelném poli. (C) Lignifikované O-ztlustliny – terciální stádium. Barveno HCl-floroglucinolem a snímáno ve světelném poli. Měřitko = 50 μm .

4.2.1.2 Exodermis

Exodermis u druhu *N. spatulata* byla pozorována jednovrstevná, dimorfní s radiálně protáhlými buňkami. V tabulce 9 je uvedeno, v jakém stádiu vývoje se nacházely buňky vrstvy exodermis v každé ze čtyř pozic. Primární stádium Casparyho proužků bylo pozorováno pouze u prvního kořene v pozici P1 (Obr. 19A), další dva kořeny měly již v této první pozici uloženy v exodermálních buňkách i suberinové lamely. Suberinové lamely byly pozorovány jako tmavě růžová linka uložena dostředivě pod primární buněčnou stěnou a zároveň jako linka při excitaci UV zářením (Obr. 19B). V terciálním vývojovém stádiu měly buňky exodermis silné vnější tangenciální buněčné stěny a slabší vnitřní (Obr. 19C). Řezy obarvené HCl-floroglucinolem ukázaly velmi slabé růžové zbarvení lignifikovaných sekundárních buněčných stěn. Propustné buňky vrstvy exodermis byly odlišné tvarem, nebyly tak radiálně protáhlé jako okolní buňky téže vrstvy a odlišovaly se i absencí sekundárních buněčných stěn (Obr. 19C). V některých z nich byla na řezu dobře viditelná jádra.

	pozice			
	P1	P2	P3	P4
kořen 1	I.	II.	III.	III.
kořen 2	II.	III.	III.	III.
kořen 3	II.	III.	III.	III.

Tabulka 9 - Vývojová stádia buněk exodermis (s výjimkou propustných buněk) kořenů *N. spatulata* ve čtyřech pozicích (P1-P4). (I.) primární stádium, (II.) sekundární stádium, (III.) terciální stádium.



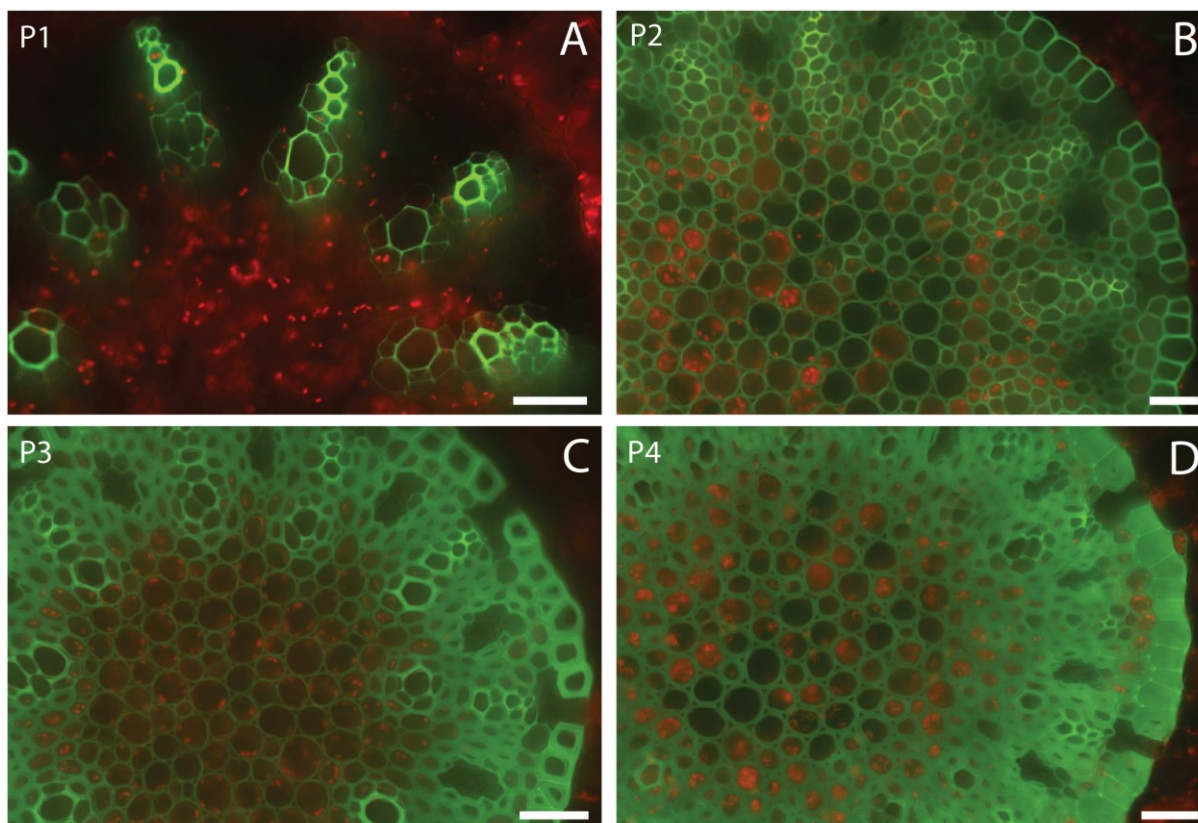
Obrázek 19 – Stádia vývoje buněk exodermis u druhu *N. spatulata*. (A) Primární stádium – Casparyho proužky. Barveno berberinem a snímáno jako fluorescence po excitaci UV zářením (Olympus U-MWU filter block). (B) Sekundární stádium – suberinové lamely. Barveno berberinem a snímáno jako fluorescence po excitaci UV zářením. (C) Terciální stádium – lignifikované sekundárních buněčné stěny. Šipka ukazuje na propustnou buňku s absencí sek. buněčné stěny. Barveno HCl-floroglucinolem a snímáno ve světelném poli. Měřítko = 50 μ m.

4.2.1.3 Střední válec

Jednotlivé kořeny se výrazněji lišily pouze v pozicích P1 a P2, kdy první z kořenů vykazoval méně pokročilý stupeň diferenciacce (Tab. 10). V pozici P1 docházelo již k diferenciaci metaxylému. U buněk základního pletiva mezi xylémovými a floémovými póly radiálního cévního svazku bylo již v první pozici patrné ukládání sekundárních buněčných stěn a jejich lignifikace. V oblasti dřene byly sekundární buněčné stěny ukládány později než u buněk mezi póly cévního svazku. V pozicích P3 a P4 byly všechny buňky středního válce (kromě oblasti floému) silnostěnné a lignifikované (Obr. 20). Tloušťka buněčných stěn byla u všech kořenů výrazně větší u buněk mezi póly cévního svazku, u kterých byl značně zmenšený prostor pro protoplast. Naopak buňky dřene měly buněčné stěny výrazně tenčí (Obr. 20).

pozice	oblast	stádium		
		1.	2.	3.
P1	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	1	2
	základní pletivo mezi póly CS	1	2	0
	dřeň	3	0	0
P2	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	1	0	2
	dřeň	1	0	2
P3	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	0	3
	dřeň	0	0	3
P4	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	0	3
	dřeň	0	0	3

Tabulka 10 – Postup diferenciacce středního válce 3 kořenů od špičky k bázi (P1-P4) u druhu *N. spatulata*. 1.stádium = většina buněk s primární buněčnou stěnou bez lignifikace; 2.stádium = část buněk tenkostěnná, část buněk silnostěnná; 3.stádium = většina buněk silnostěnná, buněčné stěny lignifikované. Intenzita zelené barvy odpovídá stupni diferenciacce. (CS) = cévní svazek.



Obrázek 20 – Postup diferenciacie středního válce *N. spatulata* od pozice P1 k P4 a zároveň ukázka výskytu chloroplastů ve středním válci ve všech čtyřech pozicích. Nebarvené řezy snímány po excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). Zelená autofluorescence lignifikovaných buněčných stěn, červená autofluorescence chloroplastů. Měřítko = 50 μ m.

4.2.1.4 Výskyt chloroplastů

Na neobarvených řezech ze všech čtyř pozic kořenů *N. spatulata* byly v epifluorescenčním mikroskopu pozorovány chloroplasty, a to jak v oblasti dřeně, tak v oblasti základního pletiva mezi póly cévního svazku (Obr. 20). S ohledem na zvyšující se intenzitu autofluorescence buněčných stěn středního válce spojenou s postupnou diferenciací směrem ke kořenové bázi nebylo možné určit rozdíl v množství chloroplastů v jednotlivých pozicích pouze na úrovni fluorescence.

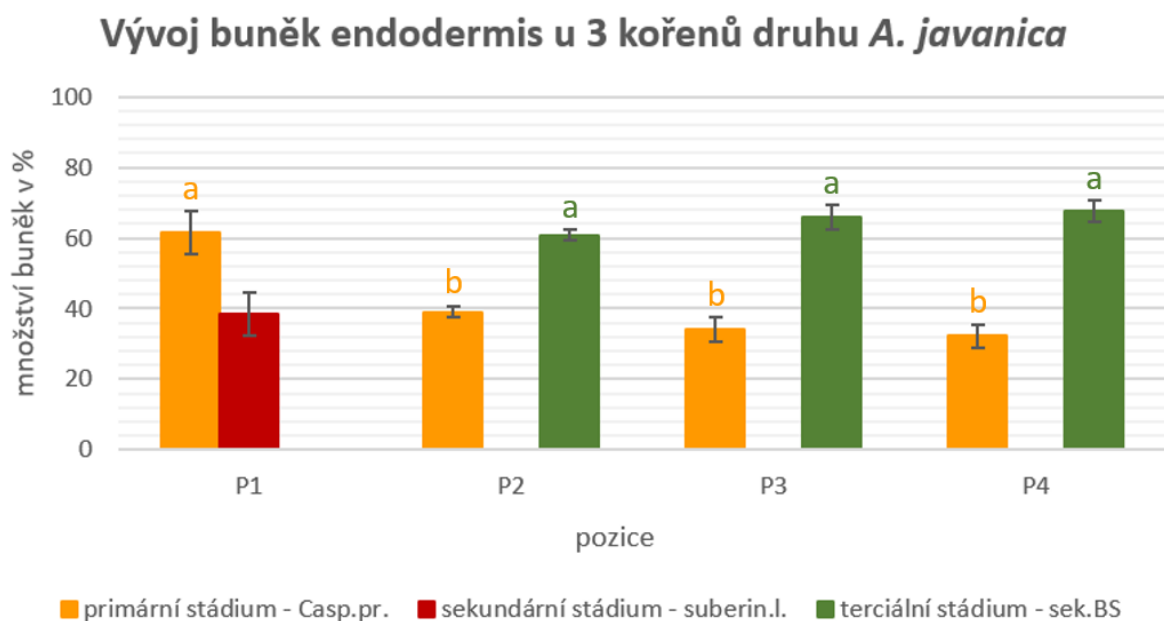
4.2.2 *Acriopsis javanica*

Odebrané tři kořeny pro tento druh se lišily ve svých délkách, které byly 20,5 cm, 29,5 cm a 16 cm.

4.2.2.1 Endodermis

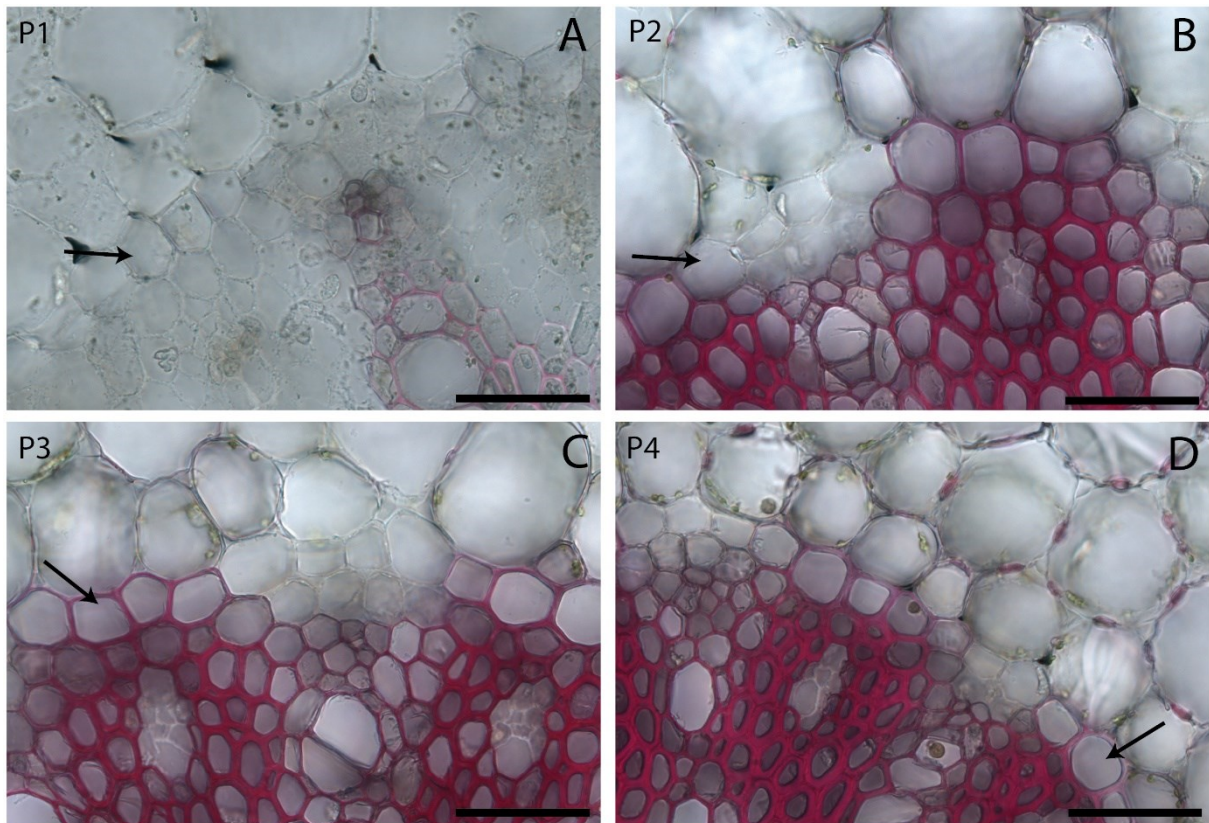
Průměrné procentuální zastoupení buněk endodermis v daných vývojových stádiích ve čtyřech pozicích je uvedeno v grafu 4. U druhu *Acriopsis javanica* se jednotlivé kořeny

odlišovaly minimálně. V pozici P1 se u všech kořenů vyskytovaly buňky v primárním a sekundárním stádiu (Obr. 22), zatímco u pozic P2, P3 a P4 byl vývoj endodermis vždy ve finálním stádiu, kdy je většina buněk ve stádiu terciálním a zbytek ve stádiu primárním (Obr. 21). Od první až ke čtvrté pozici postupně klesá množství buněk v primárním stádiu, naopak množství buněk v terciálním stádiu stoupá. Z řezů barvených berberinem byl patrný opožděný vývoj buněk naproti xylémovému pólu (Obr. 22A). Rozdíly v zastoupení buněk v primárním stádiu mezi pozicemi byly statisticky významné ($X^2_{[3,8]} = 0.67$; $P \leq 2.1 \times 10^{-7}$). Rozdíly v zastoupení buněk v terciálním stádiu v pozicích P2-P4 nebyly statisticky významné ($X^2_{[2,6]} = 0.03$; $P \leq 0.21$).

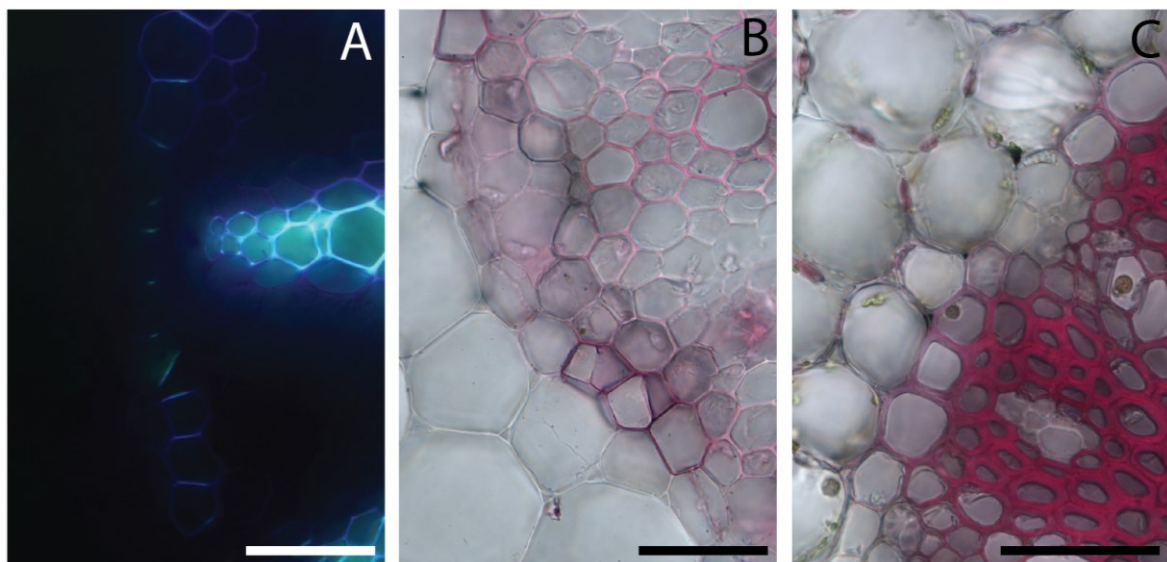


Graf 4 - Procentuální zastoupení buněk vrstvy endodermis ve třech stádiích vývoje vždy pro čtyři pozice kořene (průměr pro 3 kořeny) druhu *A. javanica*. Chybové úsečky v grafu ukazují střední chybu průměru. Rozdíly mezi zastoupením buněk mezi pozicemi byly statisticky hodnoceny pro každé stádium odděleně. Písmena nad sloupci ukazují statisticky významné rozdíly a jejich barva odpovídá skupině dat, ke které se vztahují.

Z řezů v pozicích P2 – P4 obarvených HCl-floroglucinolem bylo patrné tmavě růžové zbarvení sekundárních buněčných stěn (Obr. 21). U všech tří kořenů byla sekundární buněčná stěna uložena rovnoměrně na všech stranách buněk (tzv. O-ztlustlina). Oproti endodermis u druhu *N. spatulata* nedocházelo u druhu *A. javanica* k tak masivnímu zmenšování prostoru pro protoplast endodermálních buněk a sekundární buněčné stěny byly i v pozici P4 pozorovány pouze tenké.



Obrázek 21 – Postup diferenciace buněk endodermis *A. javanica* od pozice P1 k P4. Řezy barveny HCl-floroglucinolem a snímány ve světelném poli. Růžově zbarvené lignifikované buněčné stěny. Endodermální vrstva je označena pro lepší orientaci šipkou. (B, C, D) Terciální stádium – lignifikované O-ztlustliny. Měřítko = 50 μm .



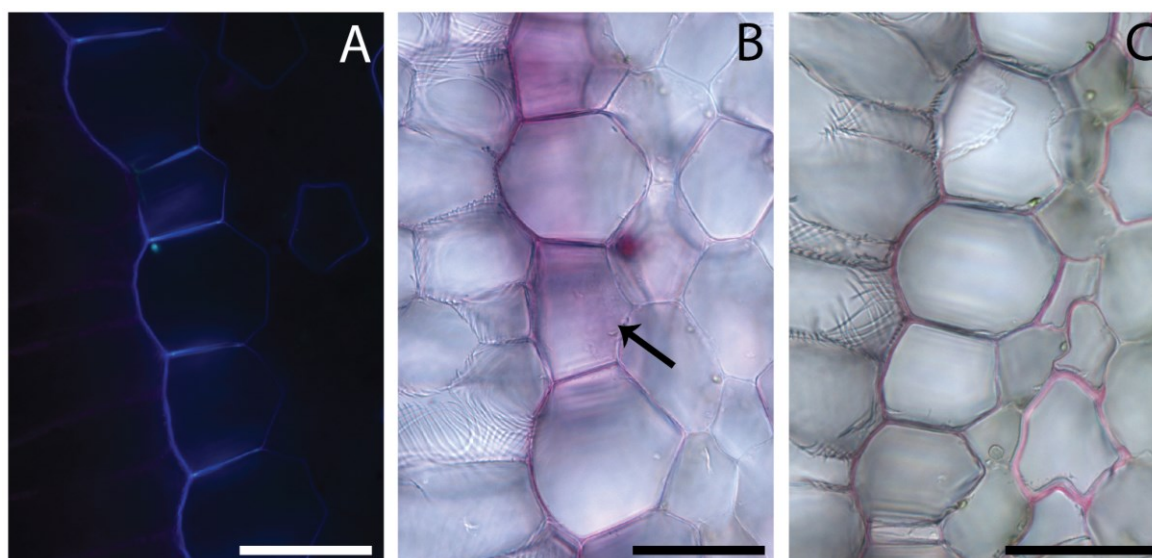
Obrázek 22 – Stádia vývoje buněk endodermis u druhu *A. javanica*. (A) Primární stádium – Casparyho proužky. Barveno berberinem a snímáno jako fluorescence po excitaci UV zářením (Olympus U-MWU filter block). (B) Suberinové lamely (červená linka) – sekundární stádium. Barveno barvivem Sudan Red 7B (Sigma) a snímáno ve světelném poli. (C) Lignifikované O-ztlustliny – terciální stádium. Barveno HCl-floroglucinolem a snímáno ve světelném poli. Měřítko = 50 μm .

4.2.2.2 Exodermis

Exodermis u druhu *A. javanica* byla pozorována jednovrstevná, dimorfní. Vývoj této vrstvy byl u všech tří pozorovaných kořenů téměř shodný (Tab. 11). V pozici P1 již byly u všech kořenů v exodermálních buňkách uloženy suberinové lamely (Obr. 23B). Stádium Casparyho proužků nebylo pozorováno, ale jejich přítomnost byla patrná při pozorování pod UV zářením (Obr. 23A) a zároveň byly pozorovány na TEM (Obr. 24). Dále od kořenové špičky (P2, P3, P4) byly již uloženy i sekundární buněčné stěny (Obr. 23C). Propustné buňky se od okolních buněk téže vrstvy odlišovaly tvarem, nebyly tak protáhlé a nebyla u nich pozorována sekundární buněčná stěna. V některých propustných buňkách byla na řezu dobře viditelná jádra.

	pozice			
	P1	P2	P3	P4
kořen 1	II.	III.	III.	III.
kořen 2	II.	III.	III.	III.
kořen 3	II.	III.	III.	III.

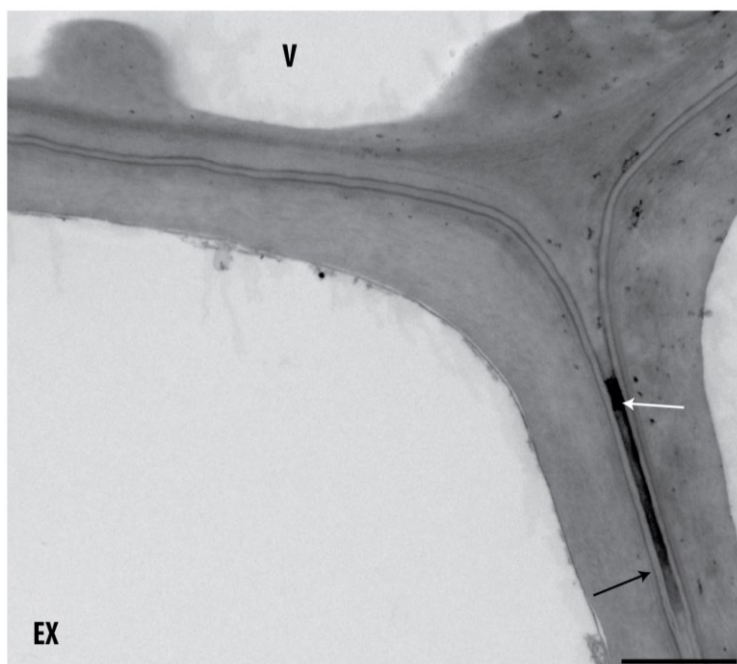
Tabulka 11 - Vývojová stádia buněk exodermis kořenů *A. javanica* ve čtyřech pozicích (P1-P4). (I.) primární stádium, (II.) sekundární stádium, (III.) terciální stádium.



Obrázek 23 – Stádia vývoje buněk exodermis u druhu *A. javanica*. (A) Suberinová lamela a výrazněji svítící Casparyho proužky. Barveno berberinem a snímáno jako fluorescence po excitaci UV zářením (Olympus U-MWU filter block). (B) Sekundární stádium – suberinové lamely. Šipka ukazuje propustnou buňku s absencí suberinové lamely. Barveno Sudan Red 7B (Sigma) a snímáno ve světelném poli. (C) Terciální stádium – lignifikované O-ztlustliny. Barveno HCl-floroglucinolem a snímáno ve světelném poli. Měřítka = 50 μ m.

Na rozdíl od silných sekundárních buněčných stěn exodermis u druhu *N. spatulata* byly u druhu *A. javanica* pozorovány značně tenké buněčné stěny, a to i v pozici P4. Zda vývoj

buněk exodermis pokračuje třetí fází (uložením sekundárních buněčných stěn) bylo tudíž ověřeno na vzorcích z pozice P2 určených pro pozorování na transmisním elektronovém mikroskopu. Na obrázku 24 lze vidět Casparyho proužek v exodermis, dále suberinovou lamelu a dostředivě rovnoměrně uloženou sekundární buněčnou stěnu. Jednalo se tedy o O-ztlustlinu. Tyto buněčné stěny se barvily HCl-floroglucinolem, byly tedy lignifikované (Obr. 23C).



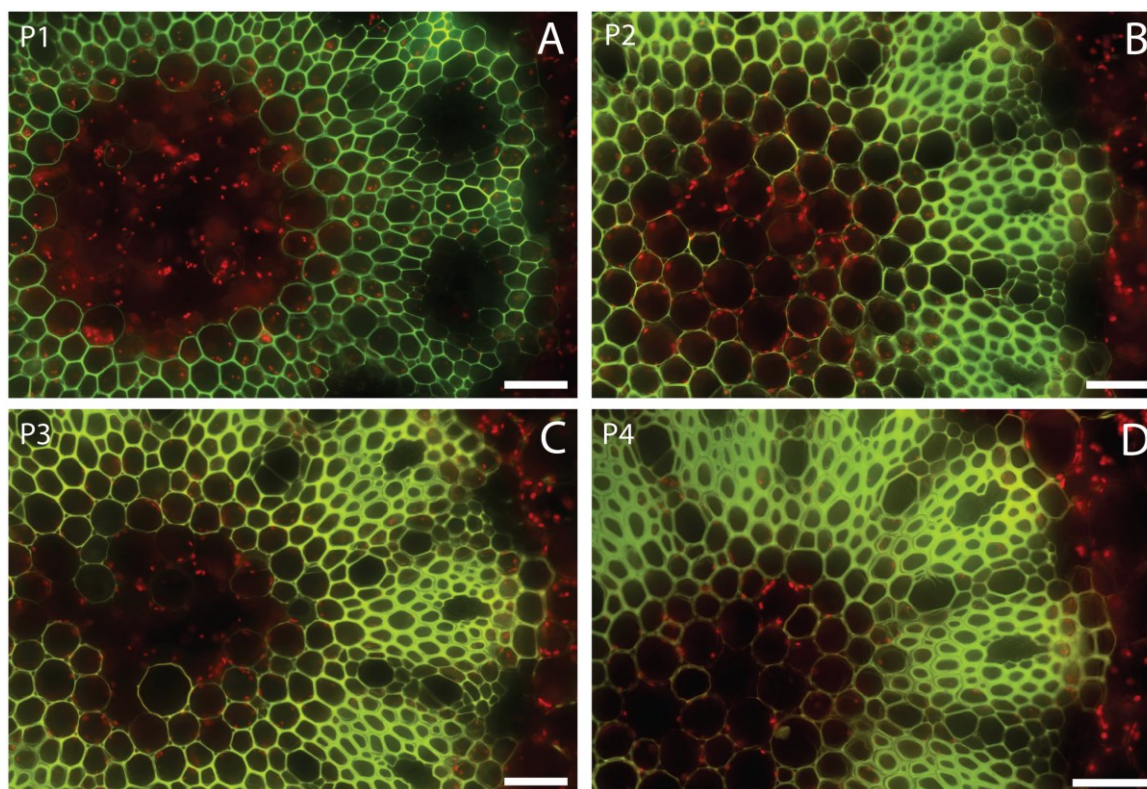
Obrázek 24 – Detail buněčných stěn buněk vrstvy exodermis druhu *A. javanica* na řezu z pozice P2. Snímek z TEM. Černá šipka ukazuje suberinovou lamelu. Bílá šipka ukazuje Casparyho proužek. (V) – buňka velamenu. (EX) – buňka exodermis. Měřítko = 1 μm .

4.2.2.3 Střední válec

V pozici P1 byla již vodivá pletiva byla plně diferencovaná (Tab. 12; Obr. 25A). U dvou kořenů byly už v této pozici všechny buněčné stěny buněk základního pletiva mezi póly CS silnostěnné a lignifikované. V pozici P2 už tomu tak bylo u všech tří kořenů. Ukládání sekundárních buněčných stěn a jejich lignifikace probíhaly u buněk dřene pomaleji. Zcela lignifikovaný a silnostěnný střední válec byl pozorován u všech tří kořenů až u kořenové báze (P4), u jednoho kořene již v pozici P3. Buněčné stěny buněk dřene byly výrazně tenčí než stěny buněk základního pletiva mezi póly CS (Obr. 25D).

pozice	oblast	stádium		
		1.	2.	3.
P1	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	1	2
	dřeň	2	1	0
P2	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	0	3
	dřeň	0	2	1
P3	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	0	3
	dřeň	0	2	1
P4	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	0	3
	dřeň	0	0	3

Tabulka 12 - Postup diferenciacie středního válce 3 kořenů od špičky k bázi (P1-P4) u druhu *A. javanica*. 1.stádium = většina buněk s primární buněčnou stěnou bez lignifikace; 2.stádium = část buněk tenkostěnná, část buněk silnostěnná; 3.stádium = většina buněk silnostěnná, buněčné stěny lignifikované. Intenzita zelené barvy odpovídá stupni diferenciacie. (CS) = cévní svazek.



Obrázek 25 – Postup diferenciacie středního válce *A. javanica* od pozice P1 k P4 a zároveň ukázka výskytu chloroplastů ve středním válci ve všech čtyřech pozicích. Nebarvené řezy snímány po excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filter). Zelená autofluorescence lignifikovaných buněčných stěn, červená autofluorescence chloroplastů. Měřítko = 50 μ m.

4.2.2.4 Výskyt chloroplastů

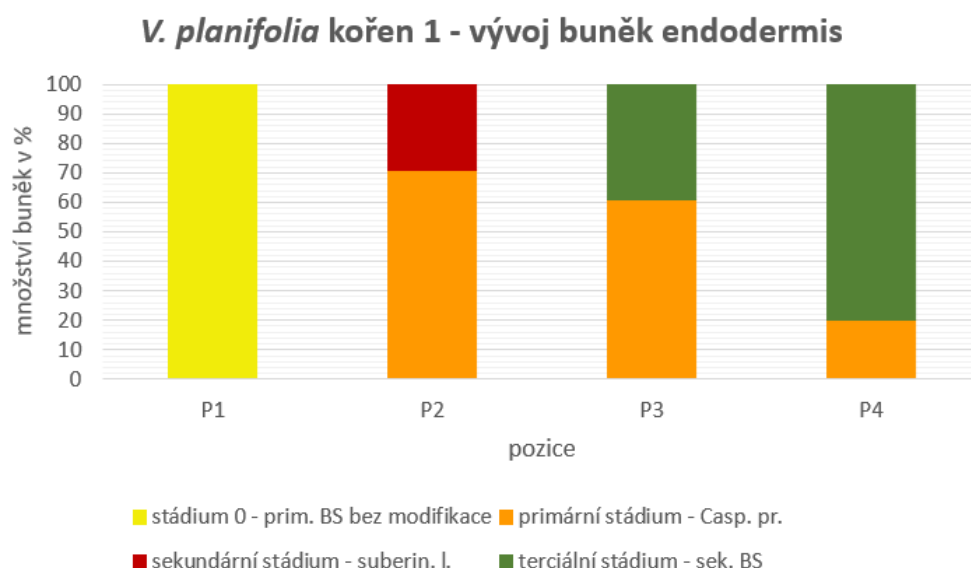
U všech tří kořenů byly na neobarvených řezech ze všech pozic (P1-P4) pozorovány chloroplasty (Obr. 25). Z důvodu silné autofluorescence buněčných stěn již od první pozice nebylo možné určit touto metodou rozdíl v množství chloroplastů napříč jednotlivými pozicemi. U všech řezů z druhého a třetího kořene byla autofluorescence buněčných stěn buněk mezi póly CS silná natolik, že znemožnila určení výskytu chloroplastů v této oblasti. V oblasti dřenež byly chloroplasty pozorovány vždy, nicméně někdy pouze ve velmi malém množství.

4.2.3 *Vanilla planifolia*

Odebrané tři kořeny pro tento druh se výrazně lišily ve svých délkách, které byly 59 cm, 13 cm a 15 cm.

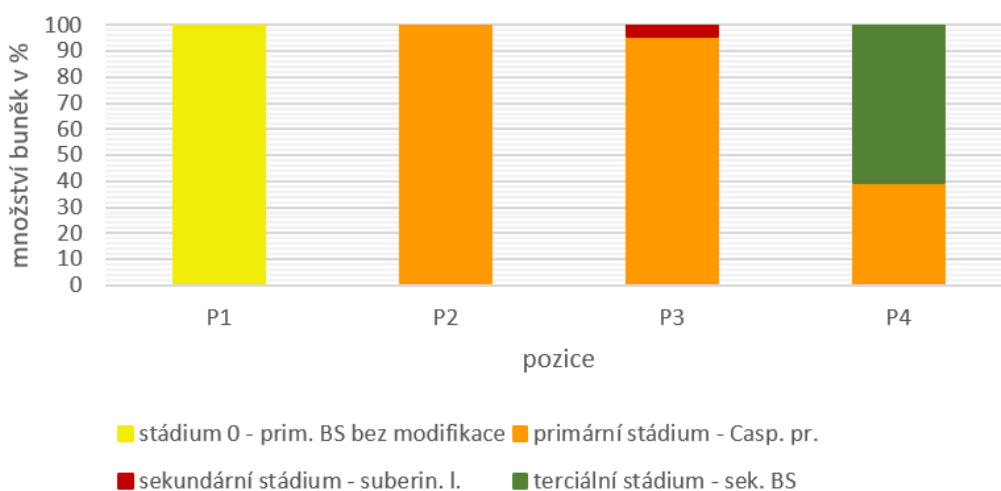
4.2.3.1 Endodermis

U druhu *Vanilla planifolia* se procentuální zastoupení buněk endodermis v daných vývojových stádiích ve čtyřech pozicích podél podélné osy kořene výrazně lišilo v každém ze tří kořenů. U tohoto druhu bylo také nutné pro účel grafického zobrazení přidat další stádium vývoje – stádium 0, kdy byly ve vrstvě endodermis pozorovány pouze buňky, které jsou v nejmladším stádiu vývoje, tzn. není u nich zatím možné detekovat Casparyho proužky (primární stádium) pomocí histochemického barvení (Obr. 26A). Pro lepší pochopení vysoké odlišnosti kořenů jsou zde uvedeny jednotlivé grafy pro každý ze tří analyzovaných kořenů.



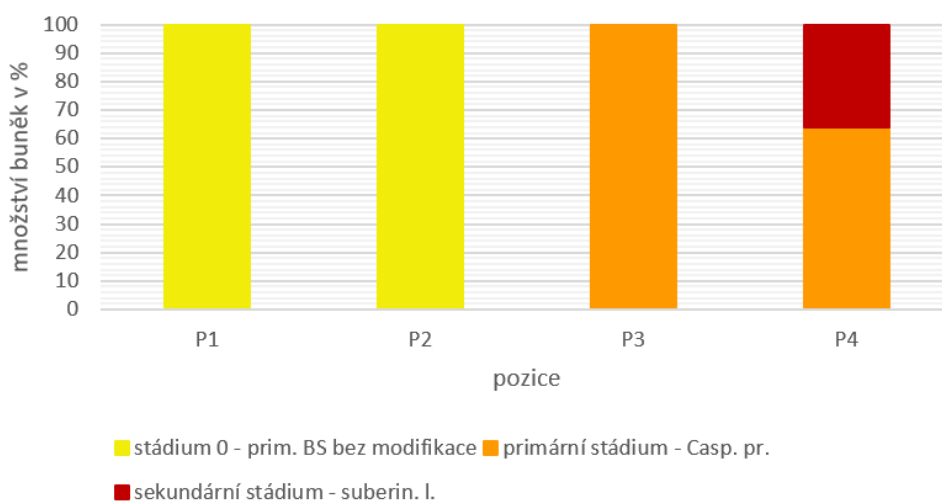
Graf 5 – Procentuální zastoupení buněk vrstvy endodermis ve čtyřech stádiích vývoje vždy pro čtyři pozice kořene č. 1 druhu *V. planifolia*. Délka kořene byla 59 cm.

V. planifolia kořen 2 - vývoj buněk endodermis



Graf 6 – Procentuální zastoupení buněk vrstvy endodermis ve čtyřech stádiích vývoje vždy pro čtyři pozice kořene č. 2 druhu *V. planifolia*. Délka kořene byla 13 cm.

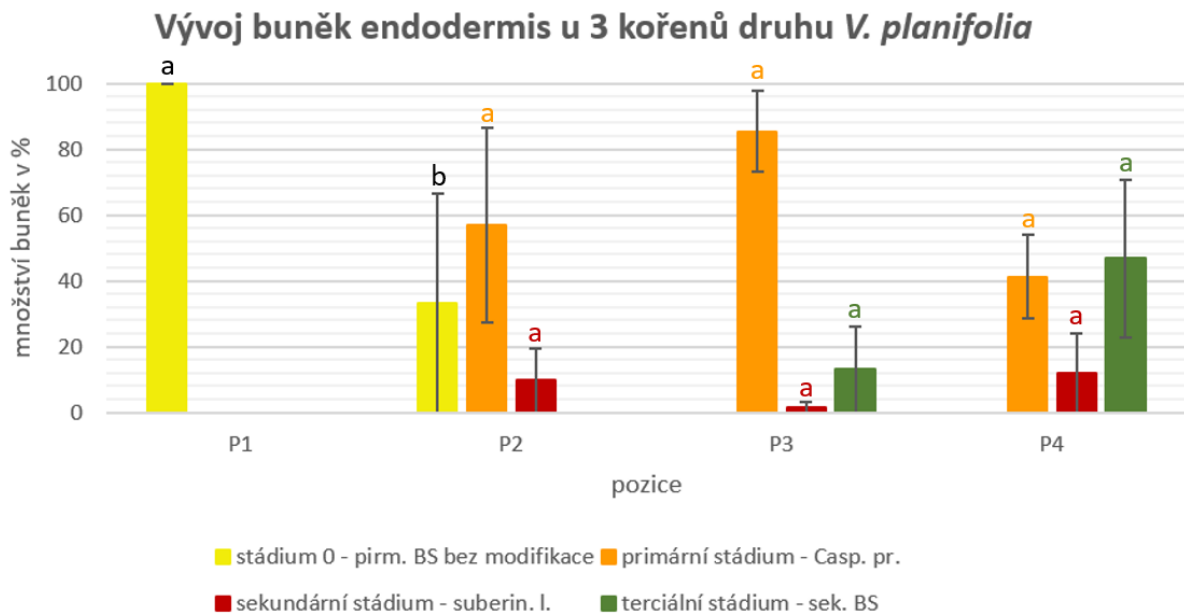
V. planifolia kořen 3 - vývoj buněk endodermis



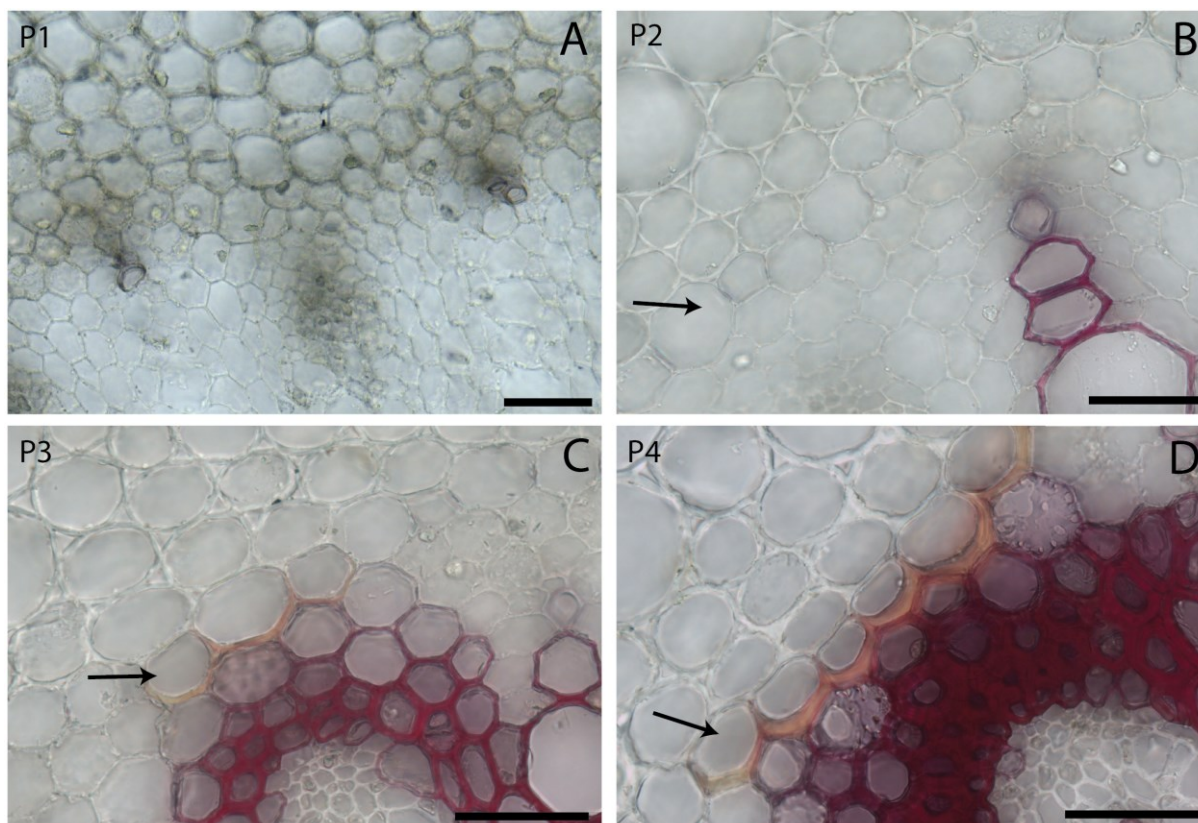
Graf 7 - Procentuální zastoupení buněk vrstvy endodermis ve třech stádiích vývoje vždy pro čtyři pozice kořene č. 3 druhu *V. planifolia*. Délka kořene byla 15 cm.

Nejméně diferencovaný byl kořen 3, u kterého bylo stádium 0 pozorováno jak v pozici P1, tak v pozici P2 u všech buněk vrstvy endodermis (Graf 7). U tohoto kořene zároveň v pozici P4 nebyly žádné buňky v terciálním stádiu. U kořenů 1 a 2 byly buňky ve stádiu 0 pouze v pozici P1 a poté v pozici P3 nebo P4 se již vyskytovala sekundární buněčná stěna (Graf 5, 6; Obr. 26). Ta byla uložena ve formě U-ztlustliny, která byla pozorována jako ztlouštění vnitřních tangenciálních a radiálních stěn endodermálních buněk (Obr. 27C). Tyto ztlustliny nebyly v žádném z kořenů lignifikované, tzn. nebarvily se HCl-floroglucinolem.

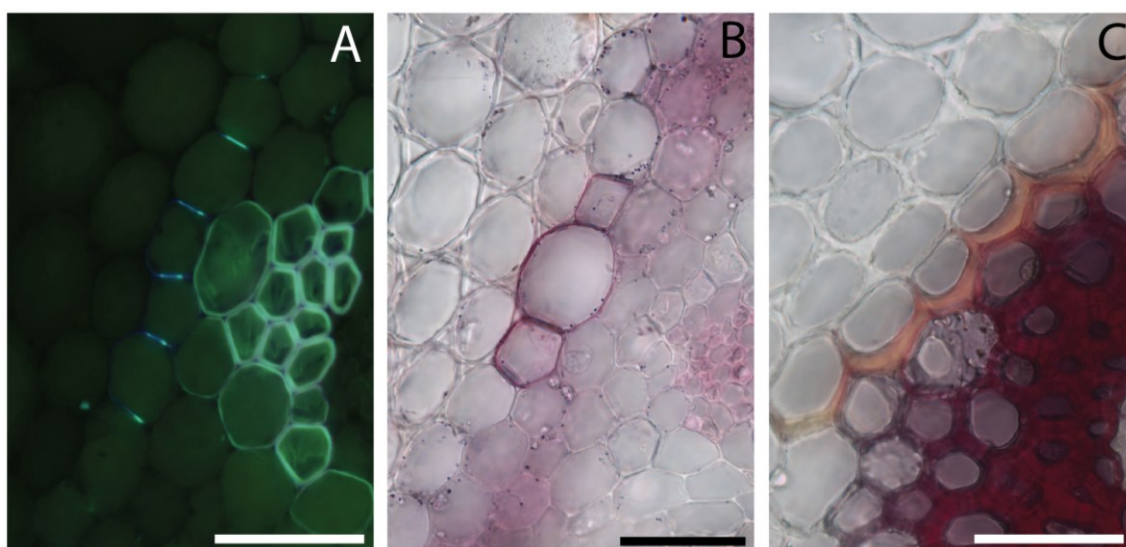
Z důvodu značně odlišného vývoje všech tří kořenů není v souhrnném grafu patrný pokles množství buněk v primárním a sekundárním stádiu (Graf 8). Jasný je pouze pokles množství buněk ve stádiu 0 a nárůst množství buněk v terciálním stádiu ve směru od špičky k bázi kořene. Vysoká odlišnost kořenů způsobila také velké směrodatné odchylky. Rozdíly v zastoupení buněk v primárním ($X^2_{[2,6]} = 1.4$; $P \leq 0.29$), sekundárním ($X^2_{[2,6]} = 0.32$; $P \leq 0.54$) ani terciálním stádiu ($X^2_{[1,4]} = 0.84$; $P \leq 0.22$) nebyly statisticky významné.



Graf 8 – Procentuální zastoupení buněk vrstvy endodermis ve čtyřech stádiích vývoje vždy pro čtyři pozice kořene (průměr pro 3 kořeny) druhu *V. planifolia*. Chybové úsečky v grafu ukazují střední chybu průměru. Rozdíly mezi zastoupením buněk mezi pozicemi byly statisticky hodnoceny pro každé stádium odděleně. Písmena nad sloupci ukazují statisticky významné rozdíly a jejich barva odpovídá skupině dat, ke které se vztahují. Pro stádium 0 byla barva písmene pozměněna z důvodu lepší viditelnosti.



Obrázek 26 – Postup diferenciace buněk endodermis *V. planifolia* od pozice P1 k P4. Řezy barveny HCl-floroglucinolem a snímány ve světelném poli. Růžové zbarvení lignifikovaných buněčných stěn. Endodermální vrstva je označena pro lepší orientaci šipkou. (C, D) Terciální stádium – nelignifikované U-ztlustliny. Měřítko = 50 μ m.



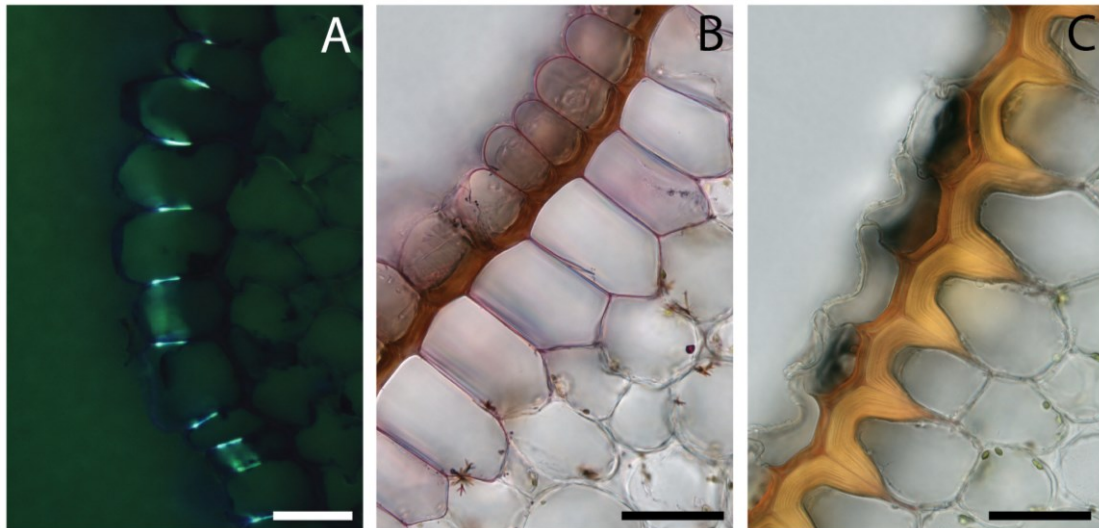
Obrázek 27 – Stádia vývoje buněk endodermis u druhu *V. planifolia*. (A) Primární stádium – Casparyho proužky. Barveno berberinem a snímáno jako fluorescence po excitaci UV zářením (Olympus U-MWU filter block). (B) Suberinové lamely (červená linka) – sekundární stádium. Barveno barvivem Sudan Red 7B (Sigma) a snímáno ve světelném poli. (C) Nelignifikované U-ztlustliny – terciální stádium. Barveno HCl-floroglucinolem a snímáno ve světelném poli. Měřítko = 50 μ m.

4.2.3.2 Exodermis

Obdobně jako u vývoje vrstvy endodermis, tak i z vývoje exodermis bylo patrné, že třetí odebraný kořen *V. planifolia* byl nejméně diferencovaný, první naopak nejvíce. U všech kořenů v pozici P1 měly buňky exodermis vytvořeny pouze primární buněčné stěny a na řezech obarvených berberinem nebyly pozorovány ani Casparyho proužky (Tab. 13). Obdobně jako u vrstvy endodermis bylo i zde využito označení tzv. stádium 0, kdy u buněk zatím není možné detekovat Casparyho proužky (primární stádium) pomocí histochemického barvení. U třetího nejméně vyvinutého kořene setrvaly buňky exodermis ve stádiu suberinové lamely (Obr. 28B) až k bázi kořene. U dvou dalších kořenů vývoj postupně došel do stádia terciálního. Sekundární buněčné stěny byly uloženy nerovnoměrně, intenzivně na vnějších tangenciálních a částečně i na radiálních stěnách. Jednalo se tedy o silné U-ztlustliny, které se nebarvily HCl-floroglucinolem, tedy nebyly lignifikované (Obr. 28C). Ve stádiu ukládání suberinové lamely byly na řezech pozorovány buňky bez této lamely, pravděpodobně tedy propustné buňky. Ve starších částech kořene bylo nicméně pozorováno uložení sekundární buněčné stěny u všech buněk exodermis na řezu a žádná buňka neodpovídala typickým znakům propustných buněk v dimorfní exodermis.

	pozice			
	P1	P2	P3	P4
kořen 1	0	II.	III.	III.
kořen 2	0	II.	II.	III.
kořen 3	0	I.	II.	II.

Tabulka 13 – Vývojová stádia buněk exodermis kořenů *V. planifolia* ve čtyřech pozicích (P1-P4). (0) primární buněčné stěny bez detekovatelných Casparyho proužků, (I.) primární stádium, (II.) sekundární stádium, (III.) terciální stádium.



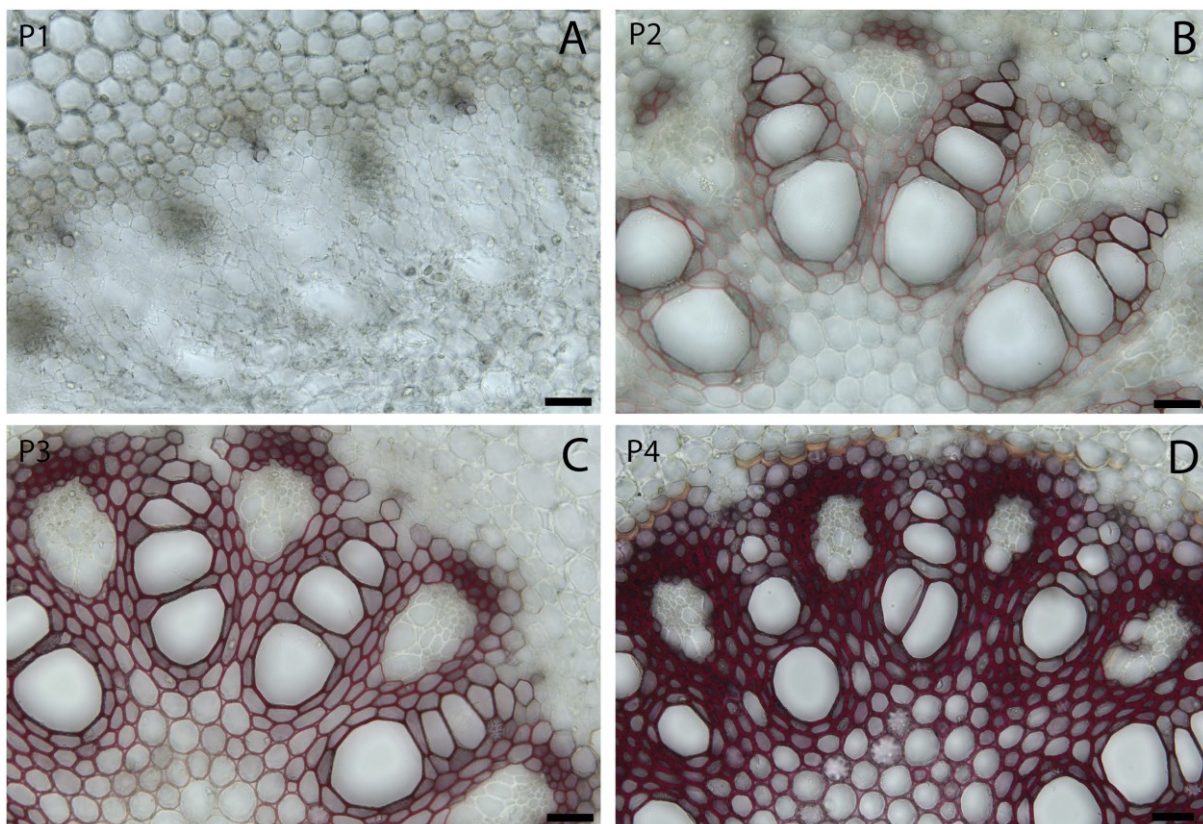
Obrázek 28 – Stádia vývoje buněk exodermis u druhu *V. planifolia*. (A) Casparyho proužky. Barveno berberinem a snímáno jako fluorescence po excitaci UV zářením (Olympus U-MWU filter block). (B) Sekundární stádium – suberinové lamely. Barveno Sudan Red 7B (Sigma) a snímáno ve světelném poli. (C) Terciální stádium – nelignifikované U-ztlustliny. Barveno HCl-fluoroglucinolem a snímáno ve světelném poli. Měřítko = 50 µm.

4.2.3.3 Střední válec

U všech tří kořenů byl z hodnocených oblastí v první pozici diferencovaný pouze protoxylém (Tab. 14; Obr. 29A). Buňky ve všech ostatních oblastech měly uloženy pouze primární buněčné stěny. Od druhé pozice docházelo hlavně k diferenciaci metaxylému a u jednoho kořene i k počátku tloustnutí a lignifikaci buněk základního pletiva mezi póly CS. Podobný vývoj byl od třetí pozice i u buněk dřene, která diferencovala později než buňky mezi póly CS. U dvou kořenů i v poslední pozici P4 zůstávala část buněk dřene neztloutlá a nelignifikovaná, zatímco buňky z ostatních oblastí středního válce již měly uloženy sekundární buněčné stěny, které se na řezech barvily po aplikaci fluorogluciolu tmavě růžově (Obr. 29).

pozice	oblast	stádium		
		1.	2.	3.
P1	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	3	0	0
	základní pletivo mezi póly CS	3	0	0
	dřeň	3	0	0
P2	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	2	1
	základní pletivo mezi póly CS	2	1	0
	dřeň	3	0	0
P3	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	2	1
	dřeň	2	1	0
P4	protoxylém	0	0	3
	metaxylém	0	0	3
	základní pletivo mezi póly CS	0	0	3
	dřeň	0	2	1

Tabulka 14 – Postup diferenciacie středního válce 3 kořenů od špičky k bázi (P1-P4) u druhu *V. planifolia*. 1.stádium = většina buněk s primární buněčnou stěnou bez lignifikace; 2.stádium = část buněk tenkostěnná, část buněk silnostěnná; 3.stádium = většina buněk silnostěnná, buněčné stěny lignifikované. Intenzita zelené barvy odpovídá stupni diferenciacie. (CS) = cévní svazek.



Obrázek 29 – Postup diferenciacie středního válce *V. planifolia* od pozice P1 k P4. Řezy barvené HCl-floroglucinolem a snímány ve světelném poli. Růžově zbarvené lignifikované buněčné stěny. Měřítko = 50 μ m.

4.2.3.4 Výskyt chloroplastů

Výskyt chloroplastů ve třech odebraných kořenech druhu *V. planifolia* v pozici P3 je uveden v kapitole 4.1. Po prohlédnutí řezů z ostatních tří pozic se u prvního kořene potvrdil nulový výskyt chloroplastů ve středním válci v celém kořeni. U druhého kořene byly chloroplasty pozorovány pouze ve dřeni, a to pouze v pozicích P3 a P4. Ve třetím kořeni byl jejich výskyt ve dřeni v pozici P3 nejednoznačný, v ostatních pozicích chloroplasty ve středním válci nebyly pozorovány vůbec.

4.3 Ultrastruktura chloroplastů

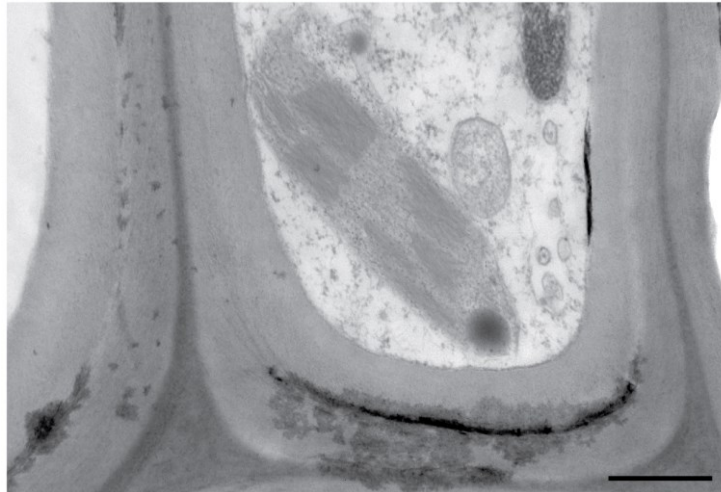
Při kvalitativním hodnocení chloroplastů s pomocí transmisní elektronové mikroskopie byly zaznamenány nápadné odlišnosti v ultrastruktuře chloroplastů středního válce a chloroplastů primární kůry (Tab. 15). Jednalo se především o rozdíly v množství přitištěných (granálních) thylakoidů tvořících grana a velikost i množství škrobových zrn v chloroplastech. Shodný byl u všech chloroplastů pouze výskyt plastoglobulů, které byly pozorovány u všech chloroplastů z obou hodnocených oblastí. Pozorována byla variabilita ve velikostech a množství plastoglobulů nicméně ne mezi oblastmi, ale mezi všemi pozorovanými chloroplasty. Tyto parametry nebyly kvantitativně hodnoceny. Detailní popis rozdílů mezi chloroplasty z odlišných oblastí kořene je uveden dále pro každý druh jednotlivě. Je ale nutné zdůraznit, že se jedná o první náhled a kvalitativní popis je pouze orientační. Na řezech byly foceny primárně chloroplasty ve stejné orientaci (podélné), nicméně jejich množství bylo často na řezu velmi nízké a dokumentace chloroplastů ve stejné orientaci nebyla vždy možná.

druh	chloroplasty středního válce				chloroplasty primární kůry		
		grana	škrobová zrna	PG	grana	škrobová zrna	PG
<i>Vanilla planifolia</i>		-	-	-	masivní	malá	ano
<i>Bulbophyllum biflorum</i>		tenká	ne	ano	masivní	malá	ano
<i>Dendrobium antennatum</i>		tenká	ne	ano	masivní	malá	ano
<i>Acriopsis javanica</i>		masivní	ne	ano	masivní	ne	ano
<i>Coryanthes leucocorys</i>		tenká	ne	ano	masivní	malá	ano
<i>Dinema polybulbon</i>		masivní	ne	ano	masivní	malá	ano
<i>Andinia longiserpens</i>		masivní	malá	ano	masivní*	velká/masivní	ano
<i>Porroglossum lorenae</i>		tenká	ne	ano	masivní*	velká/masivní	ano
<i>Eria hyacinthoides</i>	dřeň	masivní	malá	ano	masivní	malá/velká	ano
	buňky okolo CS	tenká	ne	ano			
<i>Angraecum praestans</i>		masivní	ne	ano	masivní	malá	ano
<i>Dendrophylax funalis</i>		masivní	malá	ano	masivní	malá	ano
<i>Neobathiea spatulata</i>		tenká	malá	ano	masivní	malá	ano
<i>Cleisostoma yersinii</i>		tenká*	velká/masivní	ano	masivní*	velká	ano
<i>Taeniophyllum pusillum</i>		NA	NA	NA	masivní	malá	ano

Tabulka 15 – Rozdíly v ultrastruktuře chloroplastů z oblastí primární kůry a středního válce v kořenech 14 druhů orchidejí. (PG) – plastoglobuly, (NA = chybějící data; * = nejednoznačné, vysvětleno v textu pro každý případ zvlášť; - = absence chloroplastů).

Tento první náhled na chloroplasty kořenů orchidejí s využitím transmisního elektronového mikroskopu však odhalil značné problémy ve fixaci a zalévání vzorků. I přes prodloužené časy pozvolné fixace i infiltrace zalévacím médiem byla většina řezů značně potřhaná. Účinnost prosycení médiem od velmenu až do středu kořene byla pravděpodobně s ohledem na velikost vzorků a značnou sklerifikaci buněk středního válce výrazně nižší, než je obvyklé. Některé chloroplasty ve středním válci neměly jasně viditelné membrány a jejich ultrastruktura byla celkově obtížně rozeznatelná.

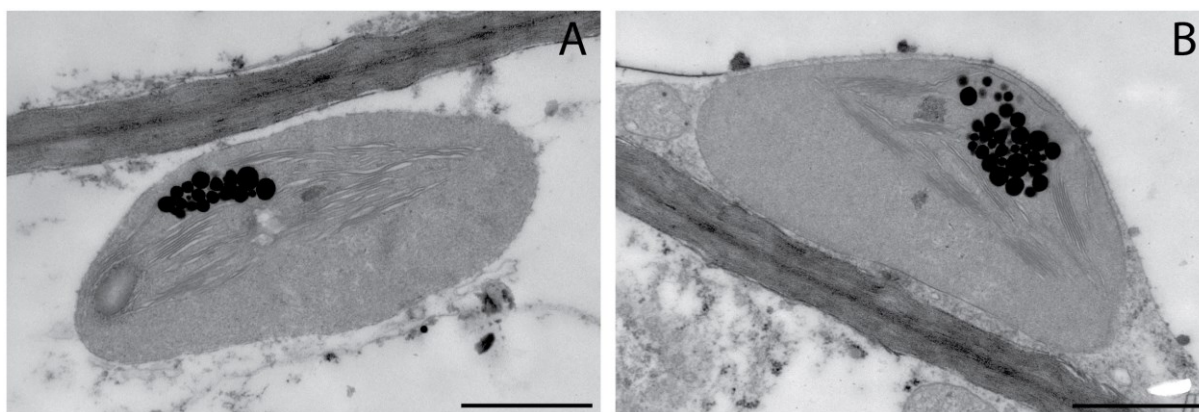
Při snímání chloroplastů v oblasti středního válce byly prohlédnuty i buněčné stěny, jejichž značná sklerifikace byla patrná již v předchozích experimentech při pozorování jejich silné autofluorescence. V tomto experimentu byl potvrzen výskyt chloroplastů v buňkách okolo xylémových a floémových pólů radiálního cévního svazku (Obr. 30). U těchto buněk byly u všech analyzovaných druhů pozorovány značně silné buněčné stěny s patrnými dostředivě uloženými vrstvami. Buňky dřeně měly u některých druhů velmi silné buněčné stěny podobně jako v předchozí oblasti (např. *A. longiserpens*, *P. lorenae*), naopak některé druhy měly buněčné stěny ve dřeni ztelně tenčí (např. *E. hyacinthoides*, *V. planifolia*).



Obrázek 30 – Chloroplast s masivními grany lokalizovaný v silně sklerifikované buňce mezi póly cévního svazku. Druh *A. javanica*, řez v pozici P3. Snímek z TEM. Měřítko = 500 nm.

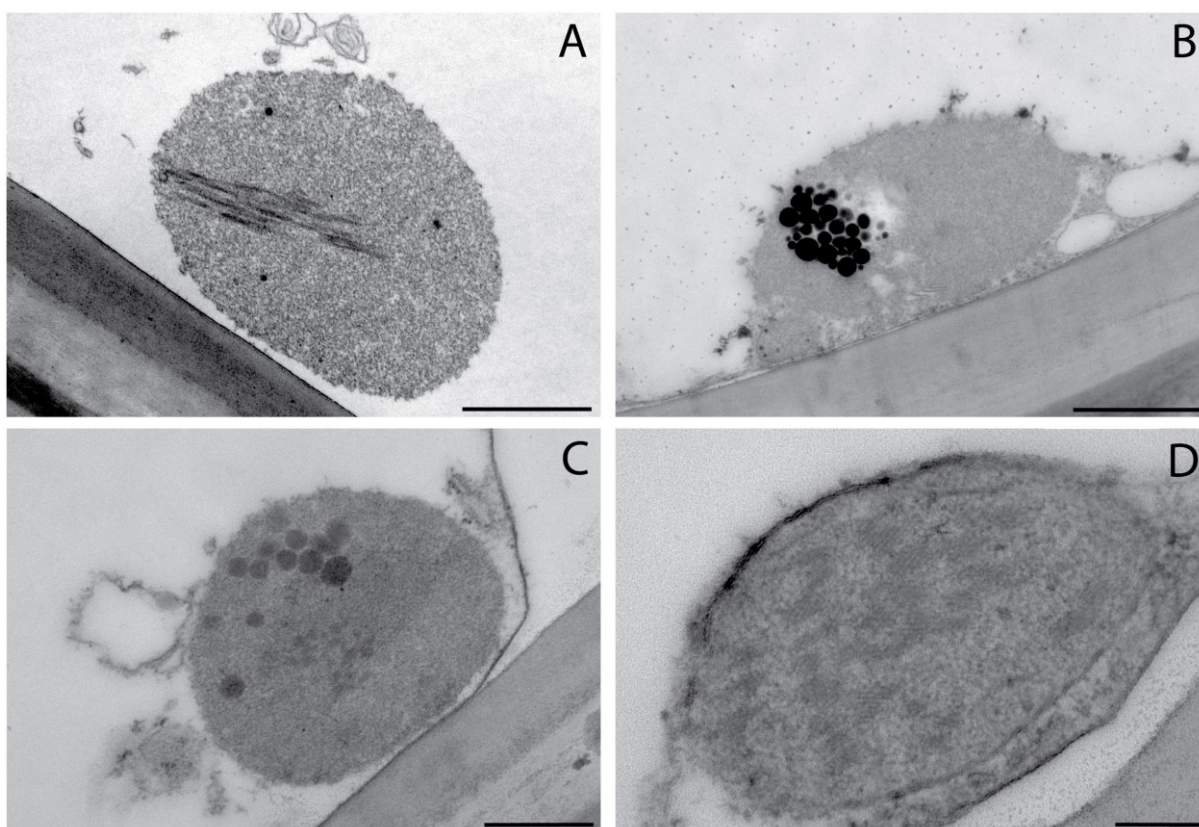
4.3.1 *Vanilla planifolia*

Z důvodu, že v předchozím experimentu při pozorování přítomnosti chloroplastů ve středním válci pomocí autofluorescence byly výsledky pozorování u tří kořenů značně odlišné, nebyl na TEM prohlédnut pouze jeden kořen tohoto druhu, ale celkem tři. Nebarvené řezy z pozice P3 ze všech těchto kořenů byly nejprve prohlédnuty pod autofluorescencí obdobně jako v předchozím experimentu. V prvním a třetím kořeni nebyly pod autofluorescencí pozorovány žádné chloroplasty ve středním válci. Ve druhém kořeni byla pozorována autofluorescence chloroplastů v oblasti dřene. Řezy ze stejné pozice ze všech tří kořenů byly po zpracování prohlédnuty na transmisním elektronovém mikroskopu. V prvním a třetím kořeni nebyly ve středním válci pozorovány žádné chloroplasty (obdobně jako u autofluorescence), u kterých by bylo z ultrastruktury patrné, že se opravdu jedná o chloroplasty. U druhého kořene byly ve středním válci pozorovány chloroplasty, jejichž ultrastruktura byla atypická. Byly v nich patrné thylakoidy a také plastoglobuly, ale pouze v malé části chloroplastu (Obr. 31).



Obrázek 31 - Atypické chloroplasty v buňkách středního válce druhého kořene *V. planifolia* snímaného na TEM. Měřítko = 1 μ m.

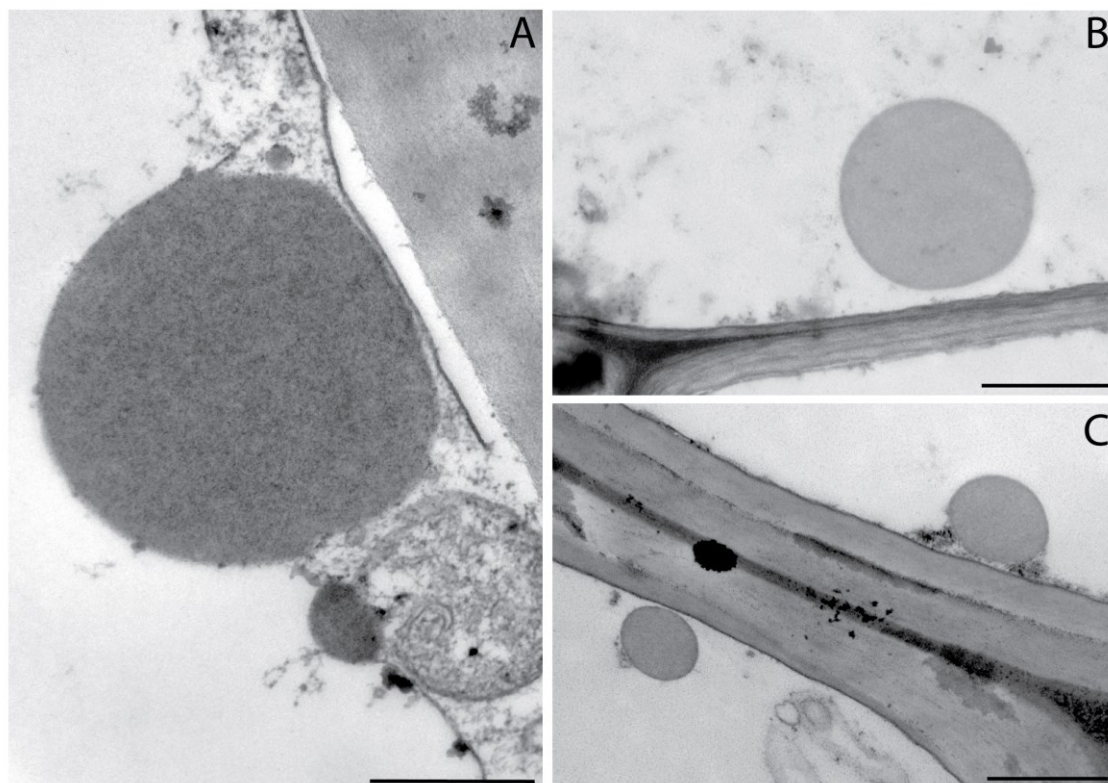
Dále se ve středním válci vyskytovaly blíže neidentifikovatelné orgány podobné chloroplastům, u kterých nebylo možné blíže charakterizovat jejich ultrastrukturu (Obr. 32). Obsahovaly útvary podobné plastoglobulům a někdy také thylakoidům. Tyto neznámé orgány byly pozorovány ve všech třech kořenech.



Obrázek 32 - Neznámé orgány v buňkách středního válce tří kořenů druhu *V. planifolia* snímaných na TEM. (A, B) Měřítko = 1 μ m. (C) Měřítko = 500 nm. (D) Měřítko = 200 nm.

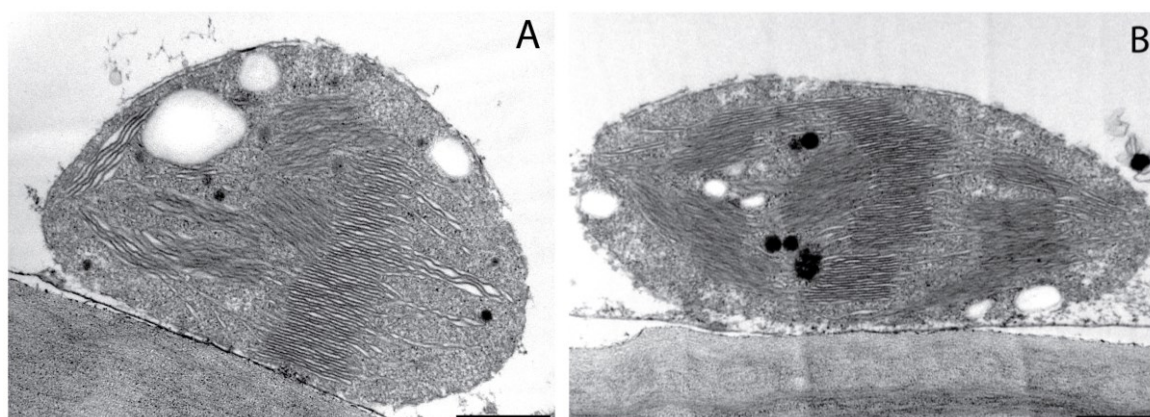
Dalšími neznámými útvary byly v průřezu zcela rovnoměrně kulaté útvary bez rozeznatelné vnitřní struktury velikostí větší než mitochondrie a připomínající tzv. fenyloplasty

(bude diskutováno v diskuzi) (Obr. 33). I tyto útvary se vyskytovaly u všech tří nasnímaných kořenů tohoto druhu, a to především v buňkách středního válce.



Obrázek 33 - Neznámé útvary pozorované v buňkách středního válce u druhu *V. planifolia*. Snímky z TEM. (A) Měřítka = 500 nm. (B, C) Měřítka = 1 μ m.

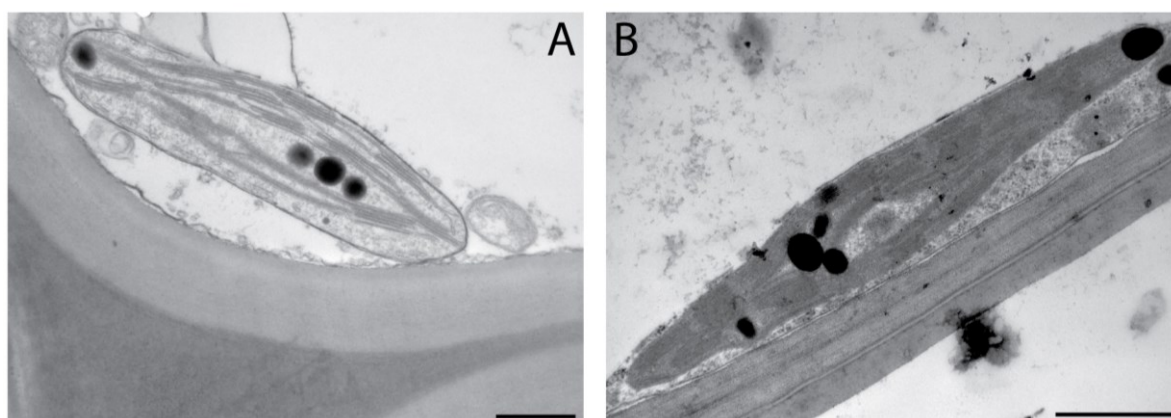
Chloroplasty v primární kůře obsahovaly vysoké množství přitíštěných thylakoidů (masivní grana) a na řezu bylo vždy patrných 1-5 malých škrobových zrn (Obr. 34).



Obrázek 34 – Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v primární kůře. Druh *V. planifolia*, první kořen. Snímky z TEM. Měřítka = 500 nm.

4.3.2 *Bulbophyllum biflorum*

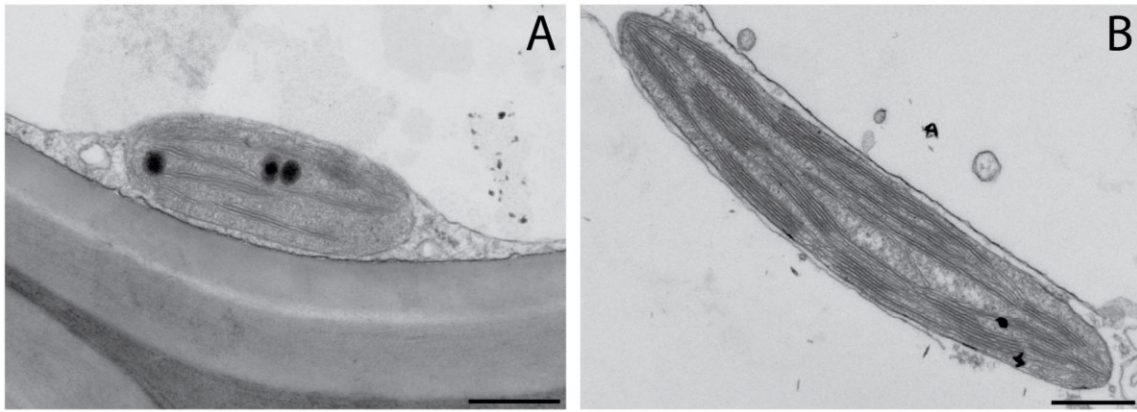
Silná autofluorescence buněčných stěn znemožnila v prvním experimentu úspěšně lokalizovat chloroplasty v buňkách mezi xylémovými a floémovými póly CS. Pozorování řezů pomocí transmisního elektronového mikroskopu přítomnost chloroplastů v těchto buňkách potvrdilo. Chloroplasty se nacházely jak v oblasti dřene, tak v buňkách mezi póly CS. Chloroplasty v oblasti celého středního válce měly nižší množství přitištěných (granálních) thylakoidů než chloroplasty v primární kůře a neobsahovaly škrobová zrna (Obr. 35A). Naopak chloroplasty v primární kůře měly značně vyšší množství přitištěných thylakoidů a grana byla tudíž širší (masivní) (Obr. 35B). Na řezech bylo v chloroplastech v primární kůře pozorováno vždy jedno škrobové zrno.



Obrázek 35 - Rozdílná ultrastruktura chloroplastů lokalizovaných ve středním válci (A) a primární kůře (B). Druh *B. biflorum*. Snímky z TEM. (A) Měřítka = 500 nm. (B) Měřítka = 1 μ m.

4.3.3 *Dendrobium antennatum*

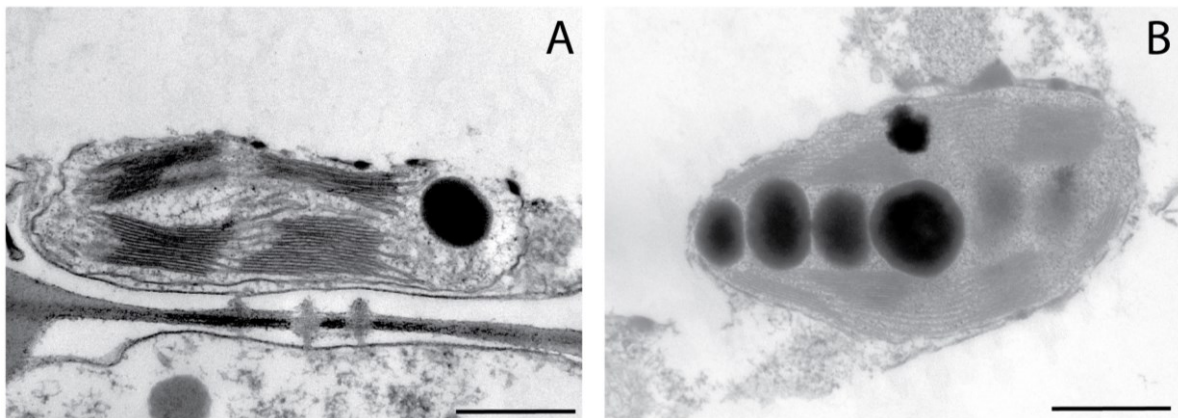
Chloroplasty byly pozorovány ve středním válci v oblasti dřene i v buňkách mezi póly CS. Buňky v obou oblastech měly uložené silné sekundární buněčné stěny, v oblasti dřene slabší. Chloroplasty ve středním válci měly nižší množství přitištěných thylakoidů (tenká grana) než chloroplasty v primární kůře a neobsahovaly škrobová zrna (Obr. 36A). Chloroplasty pozorované v primární kůře disponovaly vyšším množstvím přitištěných thylakoidů v masivních granech a v některých byla pozorována 1-2 škrobová zrna (Obr. 36B).



Obrázek 36 - Rozdílná ultrastruktura chloroplastů lokalizovaných ve středním válci (A) a primární kůře (B). Druh *D. antennatum*. Snímky z TEM. Měřítko = 500 nm.

4.3.4 *Acriopsis javanica*

Výskyt chloroplastů v oblasti dřene i v buňkách mezi póly CS byl pozorován i u tohoto druhu. V celém středním válci i v primární kůře byly pozorovány chloroplasty s vysokým množstvím přitíštěných thylakoidů, bez škrobových zrn a s vyšším množstvím často velkých plastoglobul (Obr. 37). Pozorována byla určitá variabilita mezi jednotlivými chloroplasty v obou oblastech, ale nebylo možné určit zásadní rozdíly v ultrastruktuře. Na řezech v transmisním elektronovém mikroskopu bylo možné pozorovat u buněk exodermis uložení sekundární buněčné stěny od pozice P2 (kap. 4.2.2.2.).

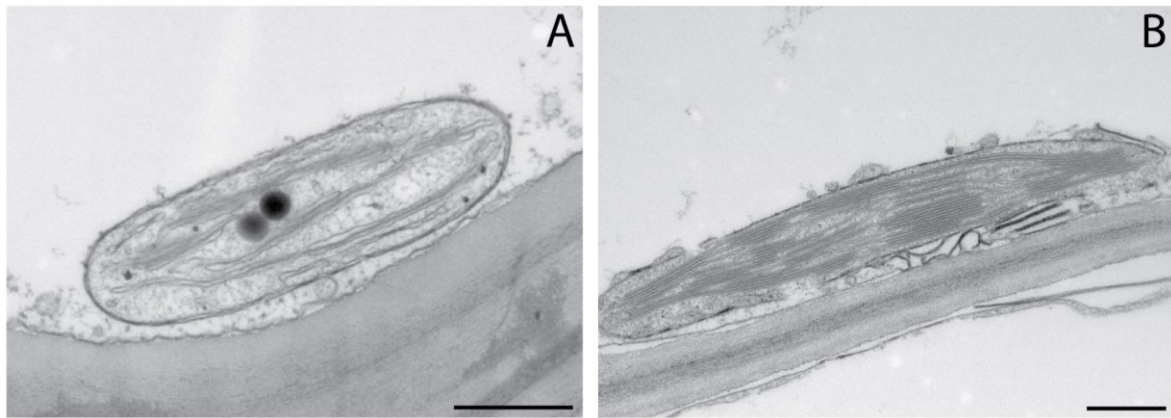


Obrázek 37 – Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných ve středním válci (A) a primární kůře (B). Druh *A. javanica*. Snímky z TEM. Měřítko = 500 nm.

4.3.5 *Coryanthes leucocorys*

U tohoto druhu rozdíl mezi chloroplasty v primární kůře a ve středním válci pozorován byl. Chloroplasty ve středním válci obsahovaly nižší množství přitíštěných thylakoidů a nebyla v nich pozorována škrobová zrna (Obr. 38A). V případě dvou chloroplastů se zdálo, že obsahují pouze nepřitíštěné thylakoidy. Naopak chloroplasty v primární kůře měly masivní grana (vyšší

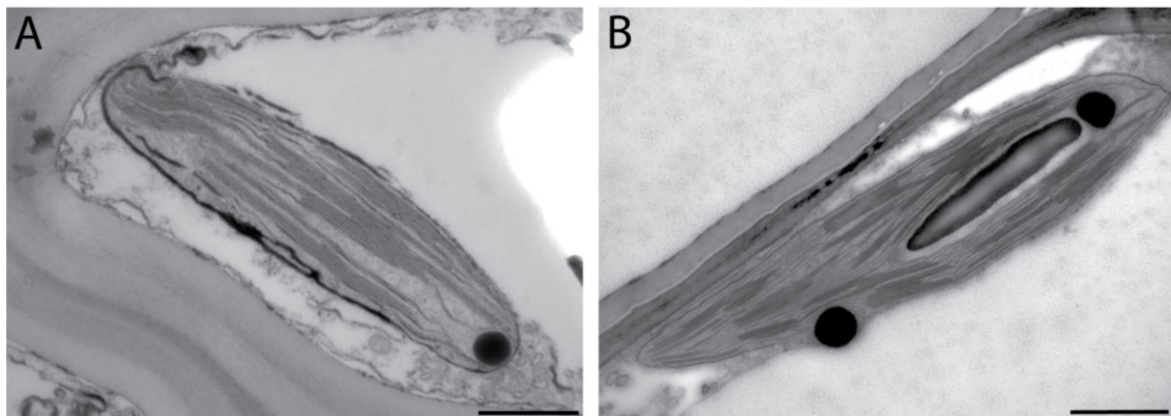
množství přitištěných thylakoidů) a v některých bylo na řezu pozorováno jedno malé škrobové zrnko (Obr. 38B). U tohoto druhu byly pozorovány na řezu menší a oválnější chloroplasty středního válce, a naopak značně větší a protáhlejší chloroplasty primární kůry.



Obrázek 38 - Rozdílná ultrastruktura chloroplastů lokalizovaných ve středním válci (A) a primární kůře (B). Druh *C. leucocorys*. Snímky z TEM. Měřítko = 500 nm.

4.3.6 *Dinema polybulbon*

Chloroplasty v primární kůře i ve středním válci měly vysoký obsah přitištěných thylakoidů (Obr. 39). Chloroplasty v primární kůře měly na řezu patrná 1-2 podlouhlá škrobová zrna, zatímco u chloroplastů ve středním válci nebyla škrobová zrna pozorována.

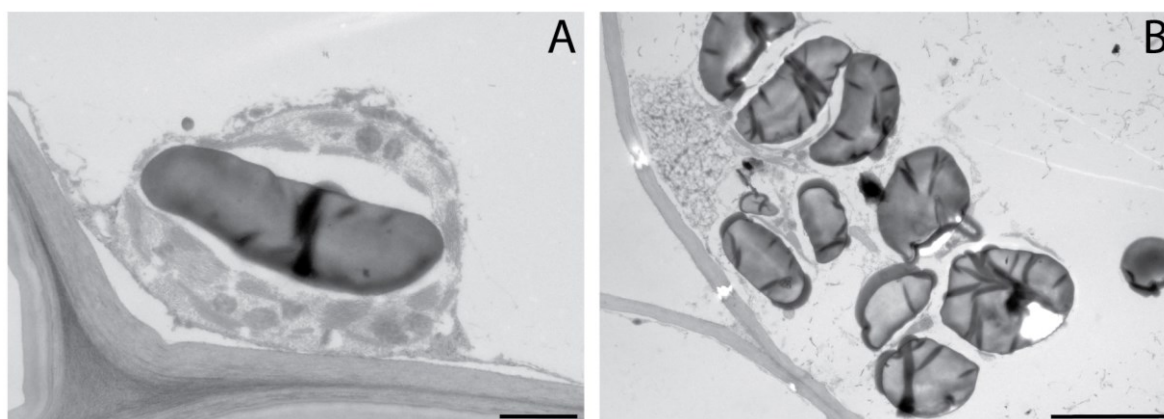


Obrázek 39 - Rozdílná ultrastruktura chloroplastů lokalizovaných ve středním válci (A) a primární kůře (B). Druh *D. polybulbon*. Snímky z TEM. (A) Měřítko = 500 nm. (B) Měřítko = 1 μ m.

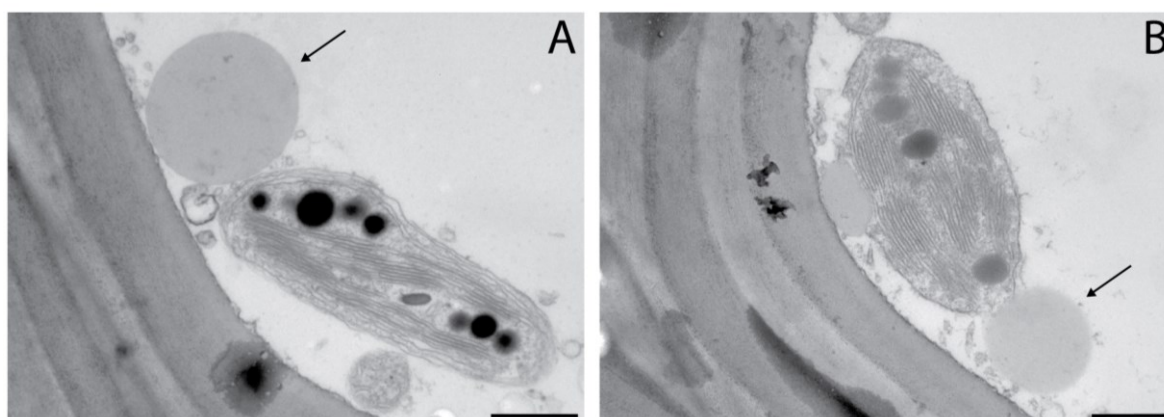
4.3.7 *Andinia longiserpens*

V primární kůře byly pozorovány chloroplasty s velkými škrobovými zrny, která zabírala značnou část chloroplastu a díky kterým bylo obtížné zhodnotit množství přitištěných thylakoidů (Obr. 40A). V případě, že byla grana v těchto chloroplastech dobře viditelná, skládala se spíše z vysokého množství přitištěných thylakoidů. V primární kůře se zároveň

nacházely i necelistvé plastidy s masivními škrobovými zrny, která zabírala většinu plochy plastidu (Obr. 40B). Pravděpodobně z důvodu odlišných vlastností škrobu a jeho okolí, byla při zpracování vzorků narušena celistvost plastidu a ty se poté zdeformovaly. Grana v tomto případě nešla optimálně zhodnotit, nicméně se zde pravděpodobně také vyskytovala a jednalo se tedy o chloroplasty (nebo chloroplasty přeměňující se na amyloplasty). V oblasti středního válce byly pozorovány chloroplasty s vysokým množstvím přitištěných thylakoidů a některé z nich měly na řezu patrné jedno malé škrobové zrno (Obr. 41). Buňky ve dřeni i v oblasti mezi póly CS měly velmi silné sekundární buněčné stěny. Podobně jako u druhu *V. planifolia* byly i u tohoto druhu ve středním válci pozorovány neznámé kulaté útvary bez rozeznatelné vnitřní struktury (Obr. 41).



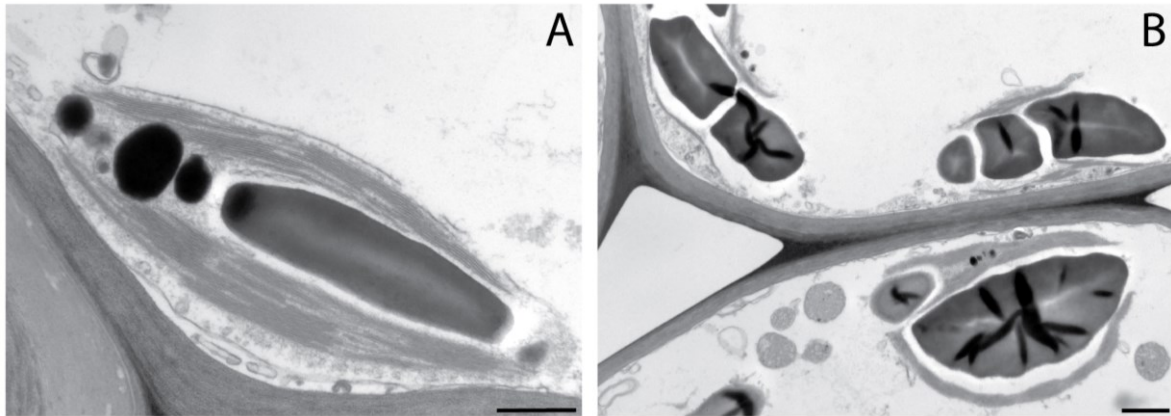
Obrázek 40 - Chloroplasty v buňkách primární kůry. Druh *A. longiserpens* (A) Detail chloroplastu s velkým škrobovým zrnem. Měřítko = 1 μm . (B) Chloroplasty s masivními škrobovými zrny. Měřítko = 5 μm . Snímky z TEM.



Obrázek 41 – Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v buňkách středního válce (A, B). Šipkou označené neznámé kulaté útvary v blízkosti chloroplastů. Druh *A. longiserpens*. Snímky z TEM. Měřítko = 500 nm.

4.3.8 *Porroglossum lorenae*

Chloroplasty v primární kůře byly na první pohled svou ultrastrukturou velice podobné chloroplastům primární kůry u předchozího popsaného druhu *Andinia longiserpens*. Pozorovány byly chloroplasty s velkým škrobovým zrnem, které zabíralo značnou část chloroplastu na řezu (Obr. 42A). Pokud byla viditelná grana, obsahovala větší množství přitíštěných thylakoidů než grana v chloroplastech středního válce. Pozorovány byly v primární kůře i necelistvé plastidy, patrně poškozené chloroplasty s masivními škrobovými zrny (Obr. 42B), podobně jako u předchozího druhu. Ve středním válci bylo pozorováno pouze malé množství chloroplastů, které měly vždy nízké množství přitíštěných thylakoidů (tenká grana) a na řezu u nich nebyla patrná škrobová zrna (Obr. 43).



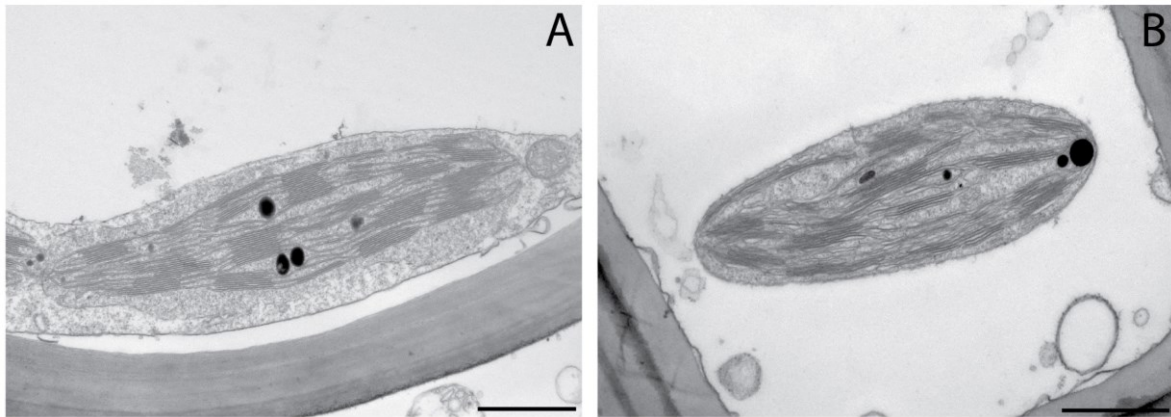
Obrázek 42 - Chloroplasty lokalizované v buňkách primární kůry. Druh *P. lorenae*. (A) Detail chloroplastu s velkým škrobovým zrnem. Měřítko = 500 nm. (B) Chloroplasty s masivními škrobovými zrny. Měřítko = 1 μ m. Snímky z TEM.



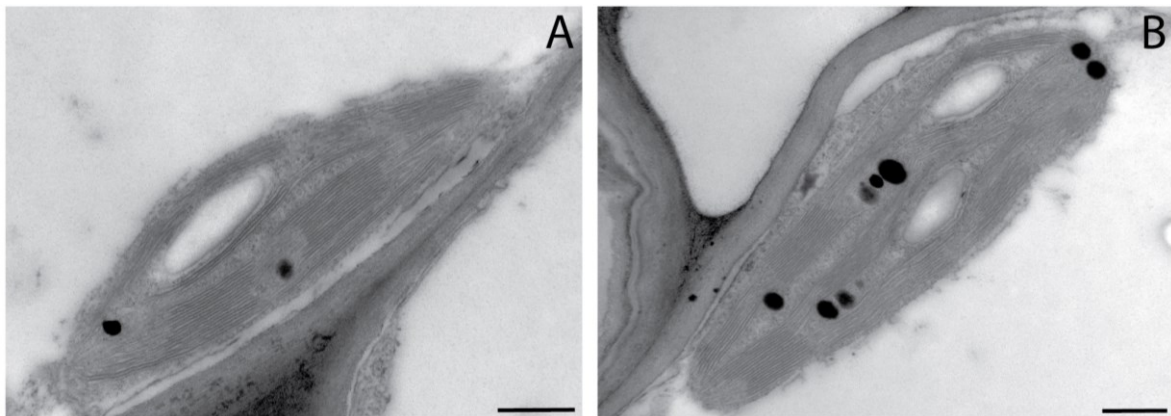
Obrázek 43 - Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v buňkách středního válce. Druh *P. lorenae*. Snímek z TEM. Měřítko = 500 nm.

4.3.9 *Eria hyacinthoides*

Kořeny druhu *Eria hyacinthoides* mají relativně velký průměr středního válce. Jelikož byl pozorován značný rozdíl v buněčných stěnách i chloroplastech v oblasti dřene a oblasti buněk mezi póly CS, byly chloroplasty hodnoceny pro tyto dvě oblasti výjimečně zvlášť. V tenkostěnných buňkách dřene byly pozorovány chloroplasty s vysokým množstvím přitíštěných thylakoidů a u některých byla na řezu patrná 1-2 škrobová zrna (Obr. 44A). Naopak ve značně silnostěnných buňkách mezi póly CS byly pozorovány chloroplasty s nižším množstvím přitíštěných thylakoidů a bez škrobových zrn na řezu (Obr. 44B). V primární kůře se nacházely chloroplasty podobné chloroplastům ve dřeni s masivními grany a 1-2 podlouhlými škrobovými zrny na řezu (Obr. 45).



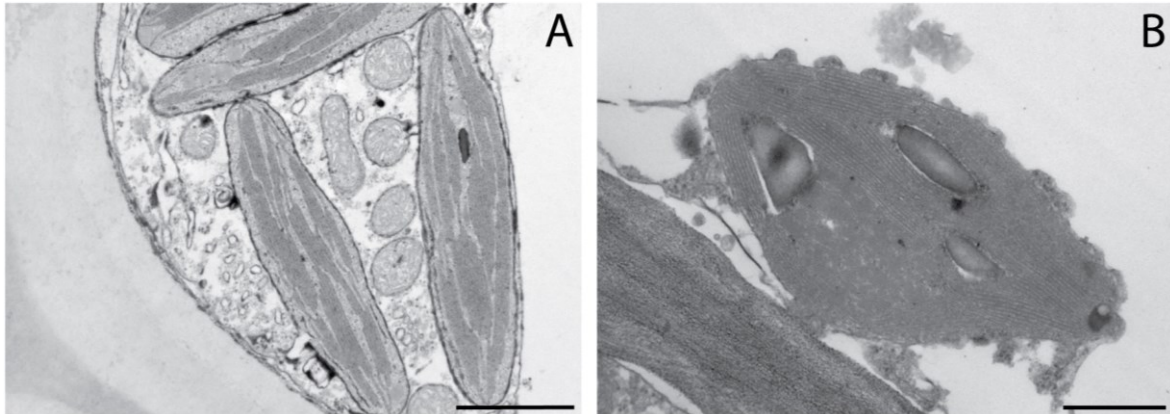
Obrázek 44 – Chloroplasty ve středním válci. Druh *E. hyacinthoides* (A) Detail chloroplastu pozorovaného v buňce dřene. Měřítko = 1 µm. (B) Detail chloroplastu pozorovaného v buňce mezi póly CS. Měřítko = 1 µm. Snímky z TEM.



Obrázek 45 - Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v buňkách primární kůry. Druh *E. hyacinthoides*. Snímky z TEM. Měřítko = 500 nm.

4.3.10 *Angraecum praestans*

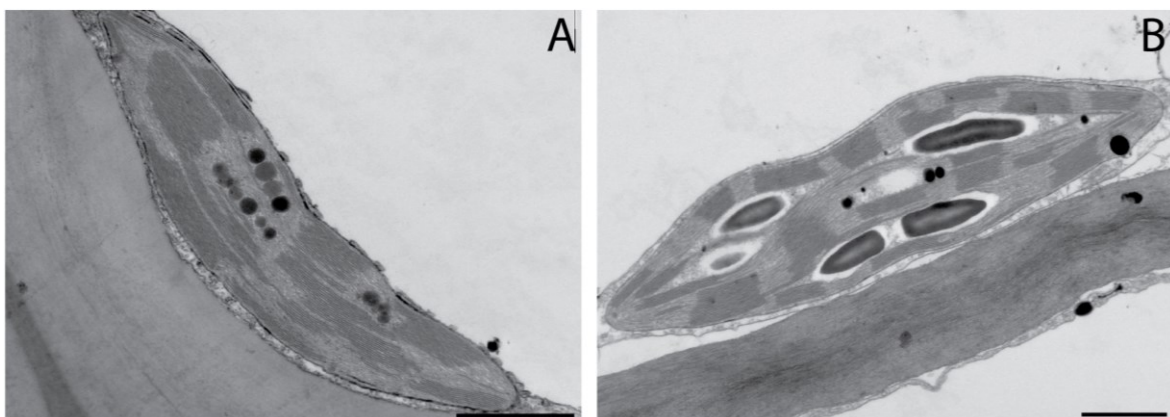
Ve středním válci byly pozorovány chloroplasty s masivními grany (Obr. 46A). U některých chloroplastů bylo na řezu patrné jedno malé škrobové zrno. I u chloroplastů v primární kůře bylo pozorováno vysoké množství přitíštěných thylakoidů a vždy 1-3 malá škrobová zrna na řezu (Obr. 46B).



Obrázek 46 - Rozdílná ultrastruktura chloroplastů ze středního válce (A) a primární kůry (B) v kořeni druhu *A. praestans*. Snímky z TEM. (A) Měřítko = 1 μ m. (B) Měřítko = 500 nm.

4.3.11 *Dendrophylax funalis*

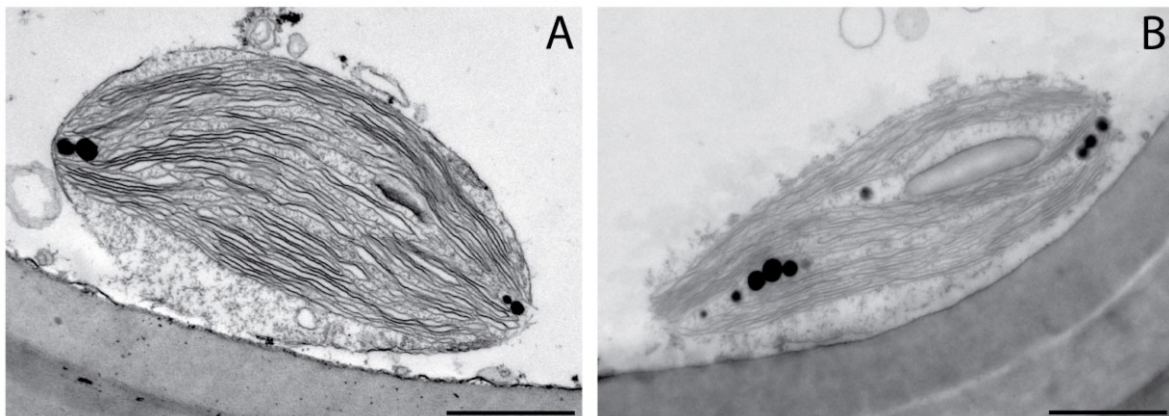
V primární kůře byly pozorovány chloroplasty s vysokým množstvím přitíštěných thylakoidů a se 2-6 malými škrobovými zrny na řezu (Obr. 47B). Naopak v oblasti středního válce bylo na řezu chloroplastem patrné buďto žádné nebo jedno malé škrobové zrno (Obr. 47A). Množství přitíštěných thylakoidů bylo na první pohled velice podobné chloroplastům primární kůry.



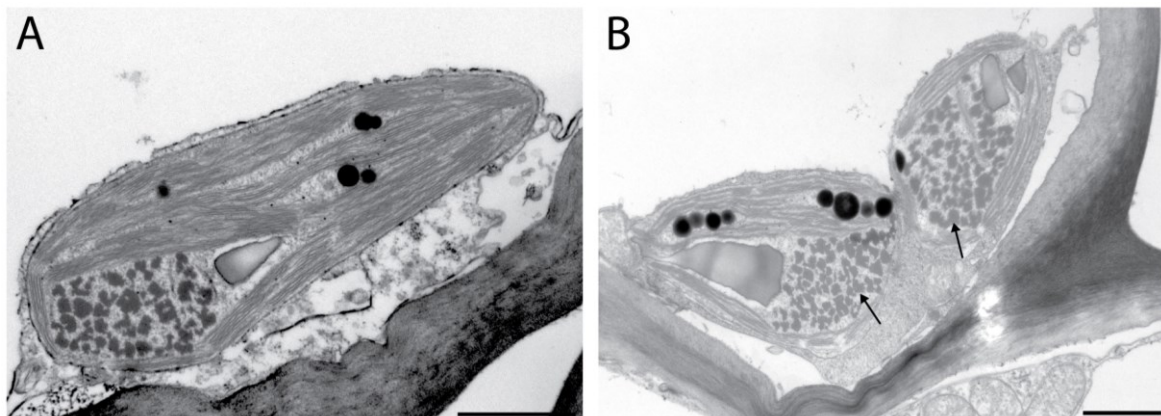
Obrázek 47 - Rozdílná ultrastruktura chloroplastů lokalizovaných ve středním válci (A) a v primární kůře (B). Druh *D. funalis*. Snímky z TEM. Měřítko = 1 μ m.

4.3.12 *Neobathiea spatulata*

U druhu *Neobathiea spatulata* byly řezy připravené pro transmisní elektronový mikroskop velice potrhané. U velkého množství pozorovaných chloroplastů byla pozorována neobvyklá ultrastruktura a často i deformace, která mohla být způsobena problémy při fixaci či zalévání vzorků do média. Některé chloroplasty neměly ani jasně viditelnou vnější membránu ohraničující chloroplast. Dobře viditelné chloroplasty ve středním válci obsahovaly spíše tenká grana, často v nich ale byly pozorovány pouze nepřitištěné thylakoidy (Obr. 48). U některých z nich bylo na řezu patrné jedno malé škrobové zrno. Chloroplasty v primární kůře měly spíše větší množství přitištěných thylakoidů a obsahovaly na řezu 1-3 škrobová zrna (Obr. 49). Právě chloroplasty v primární kůře také obsahovaly nejasné tmavé struktury ve stromatu.



Obrázek 48 - Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v buňkách středního válce. Druh *N. spatulata*. Snímky z TEM. Měřítko = 1 μm .

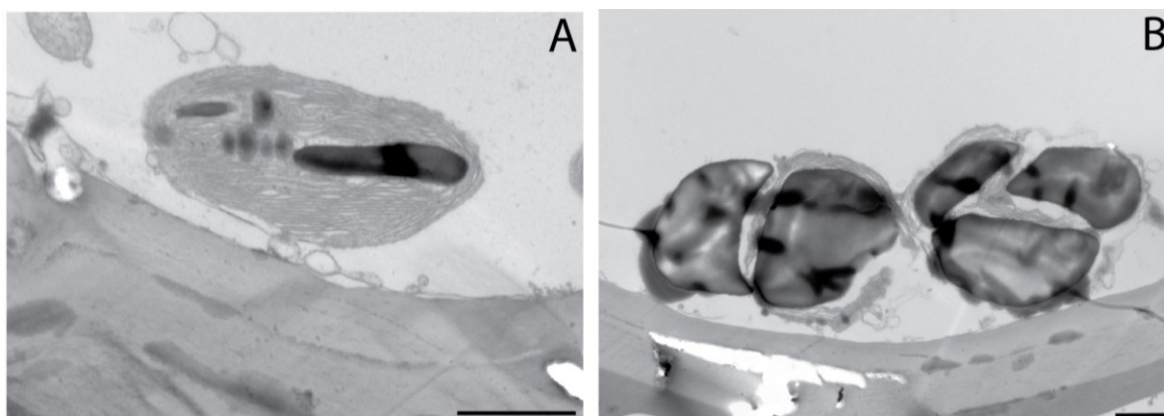


Obrázek 49 - Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v buňkách primární kůry. Druh *N. spatulata*. Šípkou označeny nejasné struktury ve stromatu. Snímky z TEM. Měřítko = 1 μm .

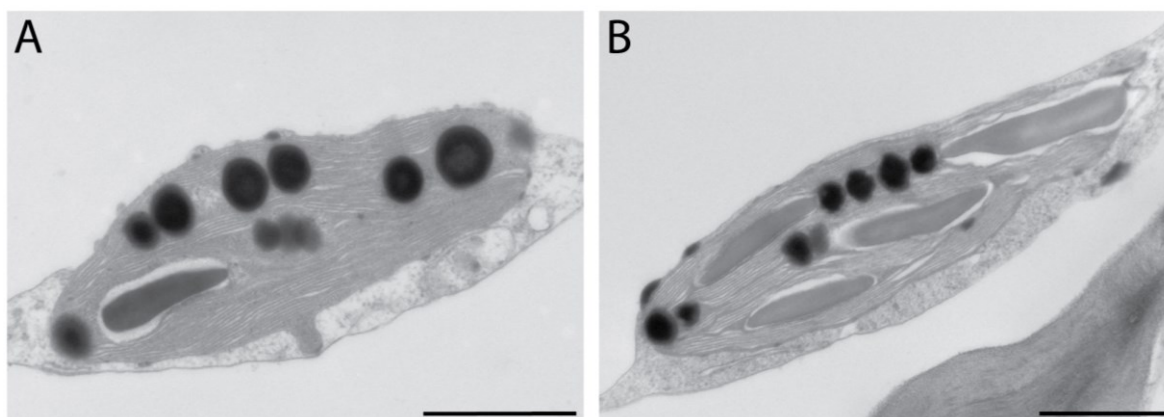
4.3.13 *Cleisostoma yersinii*

Cleisostoma yersinii je jediným druhem ze všech vybraných, u kterého byly pozorovány necelistvé plastidy, patrně poškozené chloroplasty, s masivními škrobovými zrny ve středním

válci (Obr. 50B). Tyto orgány byly velice podobné plastidům pozorovaným u druhů *A. longiserpens* a *P. lorenae* v primární kůře, a také u nich bylo obtížné charakterizovat grana. Pokud byly thylakoidy dobře viditelné, byly pozorovány spíše nepřitištěné nebo malé množství přitištěných u sebe (tenká grana). Ve středním válci se také nacházely chloroplasty celistvé s velkými škrobovými zrny (2-3 na řezu) a thylakoidy se i v těchto chloroplastech zdály na první pohled spíše nepřitištěné (Obr. 50A). V primární kůře byly na řezu pozorovány chloroplasty se 2-3 škrobovými zrny, spíše s masivními grany a velkými početnými plastoglobuly (Obr. 51). U tohoto druhu byl velký problém s trháním řezů při snímání, což je patrné z nasnímaných obrázků.



Obrázek 50 - Chloroplasty lokalizované v buňkách středního válce. Druh *C. yersinii*. (A) Detail chloroplastu s velkým škrobovým zrnem. Měřítko = 1 μm . (B) Chloroplasty s masivními škrobovými zrny. Měřítko = 1 μm . Snímky z TEM.

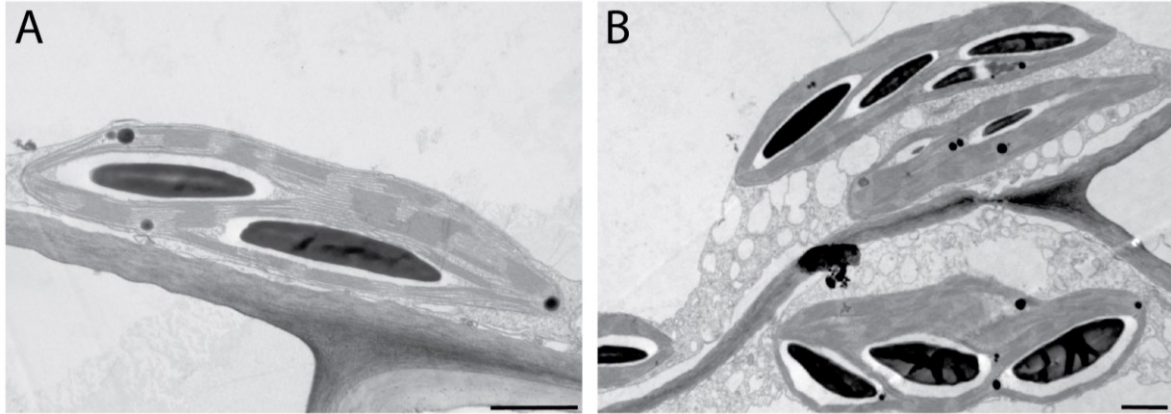


Obrázek 51 - Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v buňkách primární kůry. Druh *C. yersinii*. Snímky z TEM. Měřítko = 1 μm .

4.3.14 *Taeniophyllum pusillum*

U tohoto druhu se při odebrání segmentu kořene nepodařilo vést řez středem kořene a na řezích snímaných na konfokálním mikroskopu tak zcela chyběl střední válec. Vzorek se bohužel před dokončením diplomové práce nepodařilo nahradit. Chloroplasty v této oblasti

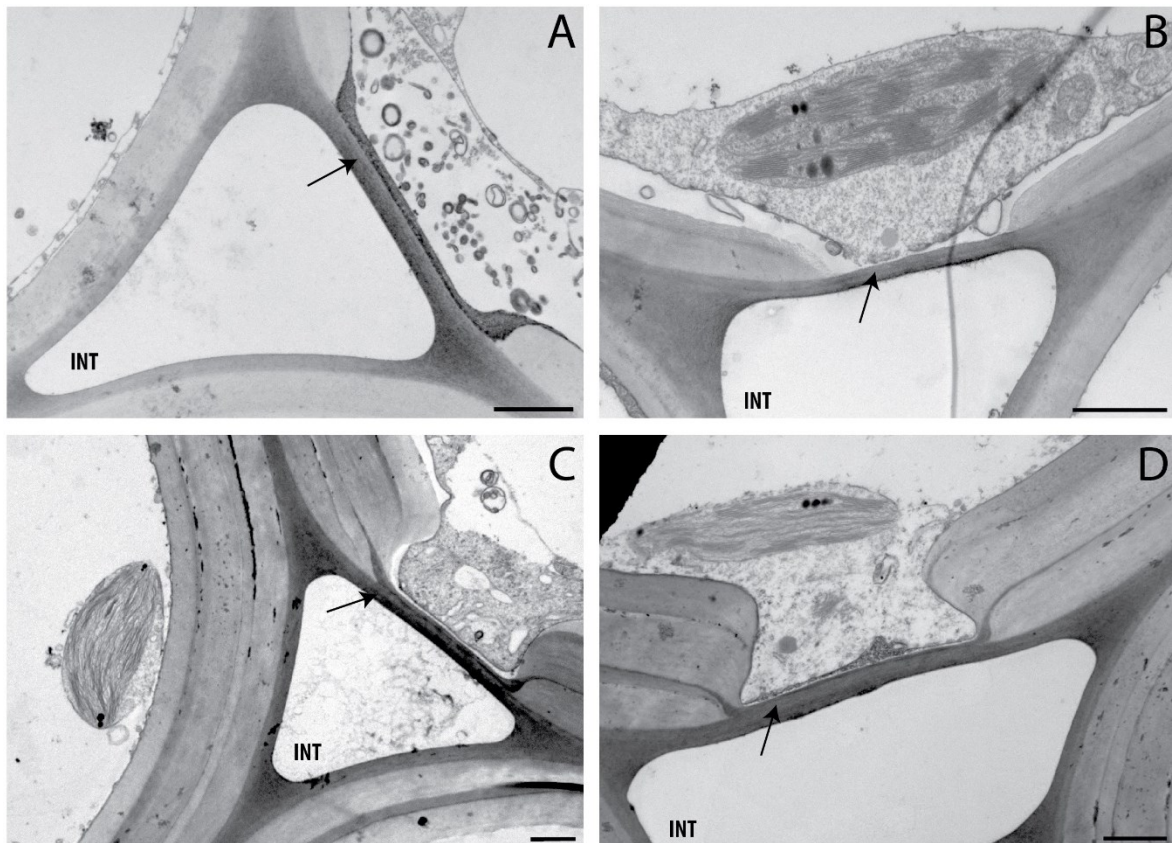
tudíž nebyly hodnoceny. Chloroplasty v primární kůře měly vysoké množství přitíštěných thylakoidů (masivní grana) a byla pro ně typická dlouhá škrobová zrna většinou v počtu 2-5 na jeden chloroplast (Obr. 52). Nicméně díky chybějícímu střednímu válci na řezech nebylo možné porovnat strukturu gran chloroplastů obou oblastí.



Obrázek 52 - Ukázka ultrastruktury chloroplastů lokalizovaných v buňkách primární kůry. Druh *T. pusillum*. Snímky z TEM. Měřítko = 1 μ m.

4.3.15 Ztenčiny buněčných stěn

Při pozorování chloroplastů byly v oblasti středního válce nalezeny výrazně ztenčené buněčné stěny sousedící s oblastí interceluláry (Obr. 53). Tyto ztenčiny byly pozorovány především ve dřeni, kde bylo intercelulár větší množství, a někdy i v jiných oblastech středního válce. Jejich přítomnost byla pozorována u všech analyzovaných druhů (kromě druhu *V. planifolia*), které měly ve dřeni středního válce přítomné interceluláry. U druhů *C. leucocorys* a *T. pusillum* nevedl řez přesně středem středního válce, na řezu chyběla oblast dřene a ztenčiny tak nemohly být pozorovány. V případě dalších čtyř druhů, konkrétně *B. biflorum*, *D. polybulbon*, *A. longiserpens* a *P. lorenae*, byl střední válec včetně oblasti dřene silně sklerifikovaný a nevyskytovaly se zde ani interceluláry. Druh *V. planifolia* byl jediným druhem, u kterého se přítomnost ztenčiny u intercelulár ve dřeni nepotvrdila.



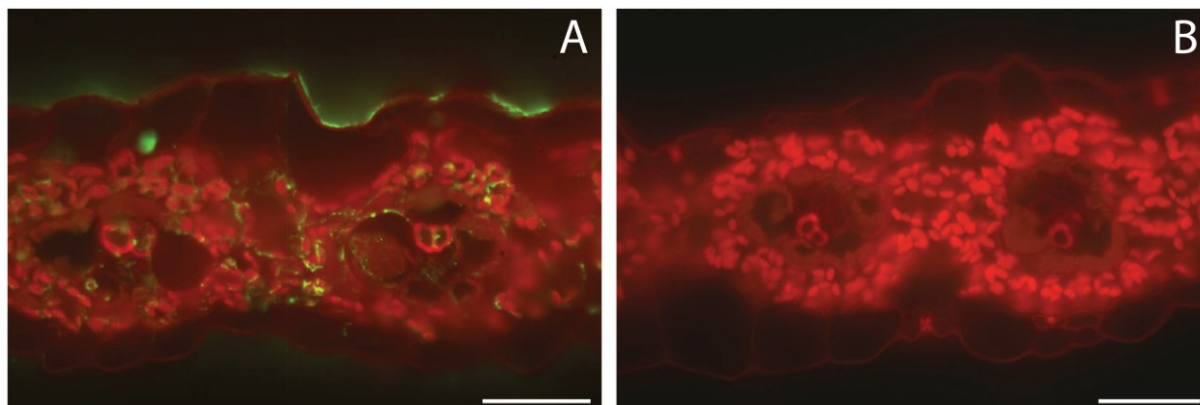
Obrázek 53 – Ztenčené buněčné stěny sousedící s oblastí interceluláry (INT). (A) *A. praestans*, (B) *E. hyacinthoides*, (C, D) *N. spatulata*. Ztenčenina vždy označena šipkou. (B, D) Chloroplasty lokalizované v těsné blízkosti ztenčeniny. Snímek z TEM. Měřítko = 1 μ m.

4.4 Imunolokalizace enzymu PEP-karboxyláza

Cílem tohoto experimentu byla přesná lokalizace enzymu PEP-karboxyláza v oblasti středního válce a primární kůry kořenů vybraných epifytických orchidejí, která nikdy předtím nebyla na kořenech orchidejí provedena. Nejprve byla metodika optimalizována pouze na listech kukuřice (*Zea mays*). Při prvním pokusu o imunodetekci chyběl ve zvoleném postupu krok, ve kterém dochází ke zvýšení propustnosti membrán (permeaci). Výsledkem byl nulový signál na ošetřených řezech při pozorování v mikroskopu. Pravděpodobně vůbec nedošlo k průniku protilátky do cytoplazmy buněk, kde se přirozeně vyskytuje enzym PEP-karboxyláza.

Při druhém pokusu o imunodetekci byla znovu využita pouze kukuřice a postup byl doplněn o krok permeace. Zároveň bylo sníženo ředění primární protilátky na 1:50. Dále byl také celý postup proveden na větším množství řezů, aby bylo možné optimalizovat délku dobarvení řezů genciánovou violetí (0,05% aq., w/v) a optimální čas dobarvení řezů byl stanoven na 1-1,5 min. Výsledkem druhého pokusu byl jasně zelený signál sekundární protilátky po excitaci modrým světlem. Tento signál se nacházel převážně v oblasti listového

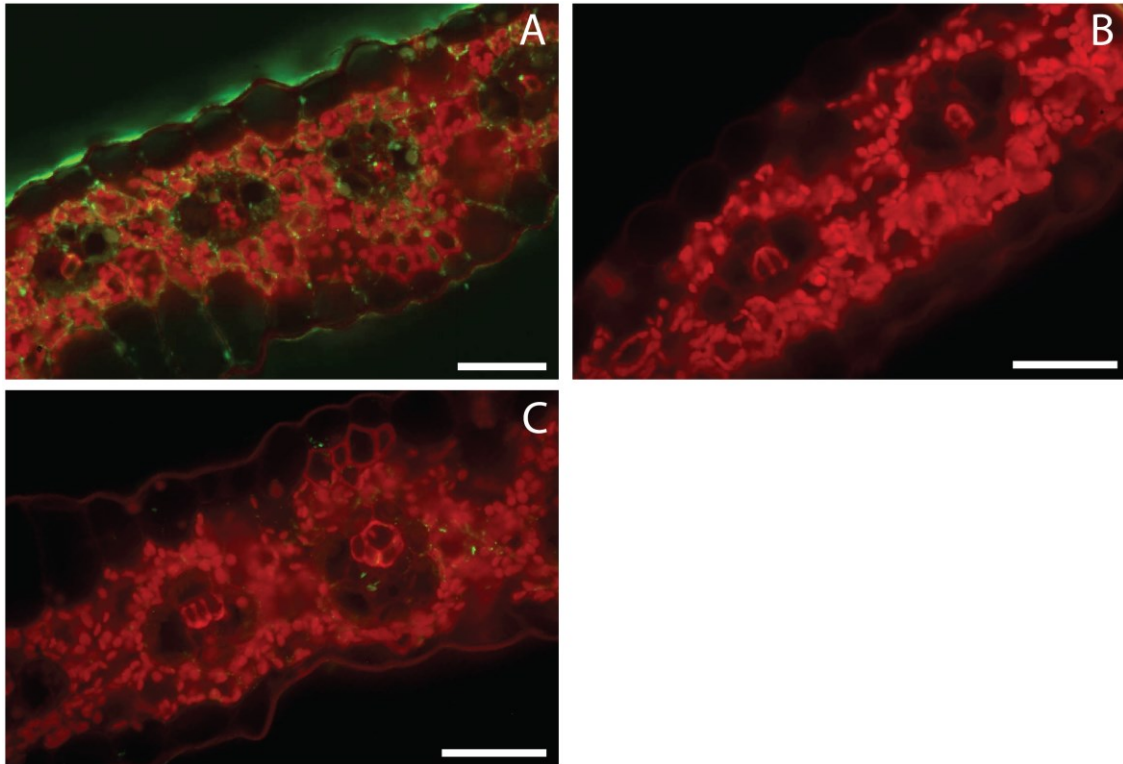
mesofylu v cytoplazmě buněk, nejvíce okolo chloroplastů (Obr. 54A). Signál byl nicméně pozorován také na povrchu listové pokožky a občas i náhodně v oblasti cévního svazku.



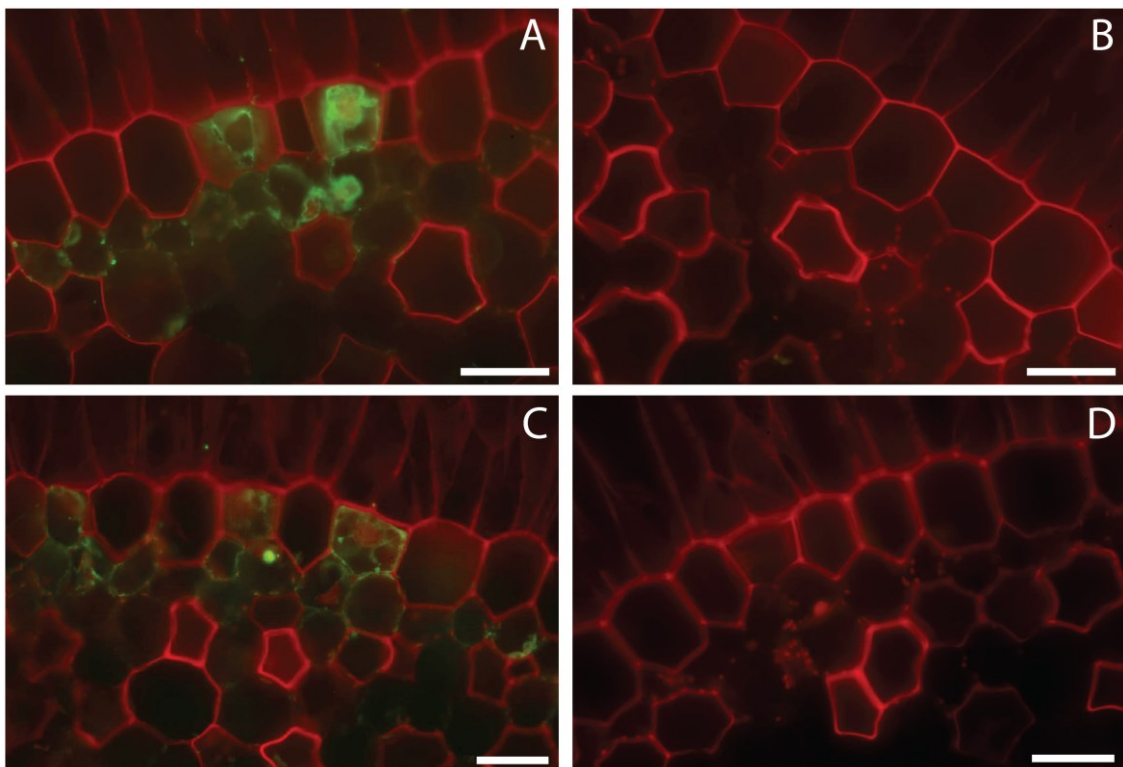
Obrázek 54 – Imunodetekce enzymu PEP-karboxyláza v listech kukuřice. Dobarvení genciánovou violetí 5 min. (A) Signál protilátky po excitaci modrým světlem (Olympu U-MWB filtr). (B) Negativní kontrola. Měřítko = 50 μm .

Finální imunodetekce byla provedena jak na řezech z listu kukuřice, tak na řezech z kořenů orchidejí *Neobathiea spatulata* a *Acriopsis javanica*. Postup byl obohacen ještě o přidání kaseinu (1,5% kasein v PBS) pro blokaci nespecifické vazby. Při tomto pokusu bylo zároveň zvýšeno ředění primární protilátky na 1:100, a to s ohledem na silný signál při předchozím pokusu a také s ohledem na cenu protilátky.

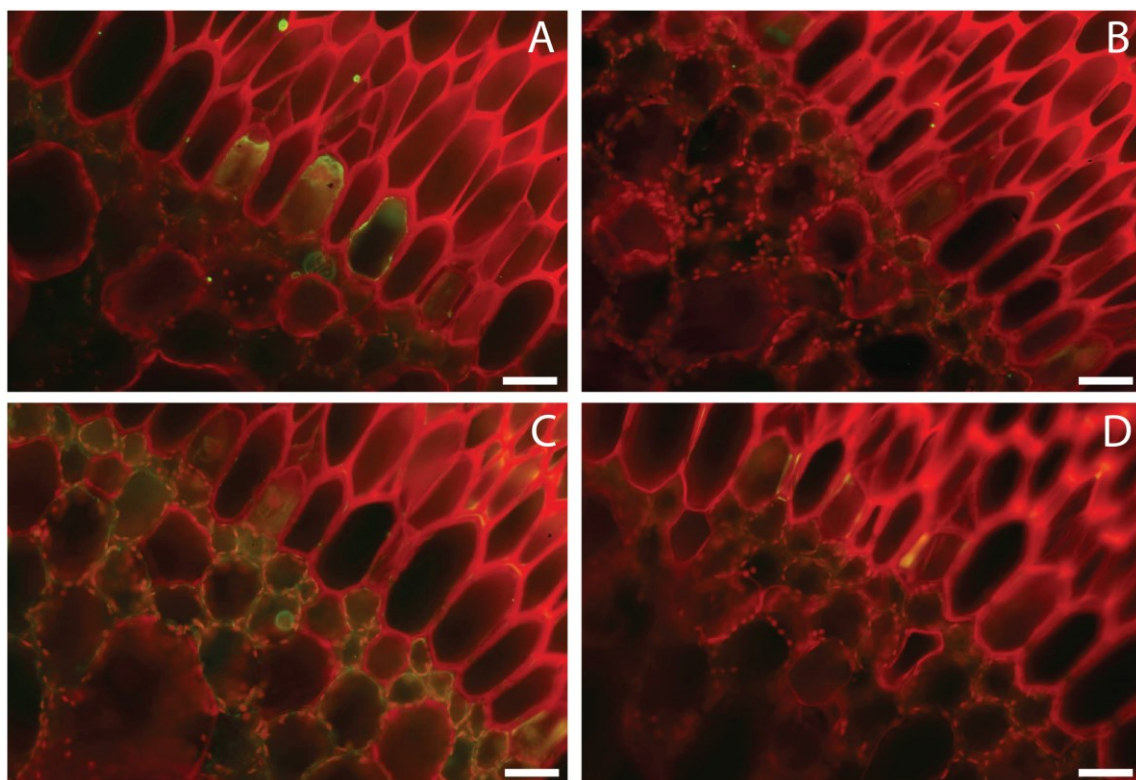
U kukuřice na řezech s kaseinem byl signál téměř nepozorovatelný oproti řezům, na které nebyl aplikován kasein. Signál byl pozorován pouze okolo několika chloroplastů v mezofylových buňkách (Obr. 55C). Výsledky z řezů kukuřice bez kaseinu se shodovaly s výsledky z výše uvedeného druhého pokusu, kdy byl pozorován silný signál jak v cytoplazmě buněk listového mesofylu, tak i na povrchu pokožky a také náhodně v oblasti cévních svazků (Obr. 55C). U obou orchidejí byl pozorován lokalizovaný signál v propustných buňkách exodermis a slabší signál v buňkách přilehlé vnější oblasti primární kůry sousedící s vrstvou exodermis. V oblasti středního válce žádný signál detekovaný nebyl. U druhu *N. spatulata* zasahoval signál o něco hlouběji do primární kůry (Obr. 57), naopak u druhu *A. javanica* byl hlavně v prvních dvou vrstvách buněk primární kůry pod vrstvou exodermis (Obr. 56). Na řezech s kaseinem nebyl signál tak silný jako na řezech bez kaseinu, nicméně jeho lokalizace byla v obou případech shodná.



Obrázek 55 – Imunodetekce enzymu PEP-karboxyláza v listech kukuřice. Dobarvení genciánovou violetí 2 min. Signál protilátky po excitaci modrým světlem (Olympu U-MWB filtr). (A) Řez neošetřený kaseinem. (B) Negativní kontrola k řezu neošetřenému kaseinem. (C) Řez ošetřený kaseinem. Měřítka = 50 μm .



Obrázek 56 – Imunodetekce enzymu PEP-karboxyláza v kořenu *A. javanica*. Dobarvení genciánovou violetí 2 min. Signál protilátky po excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filtr). (A) Řez neošetřený kaseinem. (B) Negativní kontrola k řezu neošetřenému kaseinem. (C) Řez ošetřený kaseinem. (D) Negativní kontrola k řezu ošetřenému kaseinem. Měřítka = 50 μm .



Obrázek 57 – Imunodetekce enzymu PEP-karboxyláza v kořenu *N. spatulata*. Dobarvení genciánovou violetí 2 min. Signál protilátky po excitaci modrým světlem (Olympus U-MWB filtr). (A) Řez neošetřený kaseinem. (B) Negativní kontrola k řezu neošetřenému kaseinem. (C) Řez ošetřený kaseinem. (D) Negativní kontrola k řezu ošetřenému kaseinem. Měřítka = 50 μm .

5 Diskuze

5.1 Diferenciace kořenů

Analýza postupu diferenciace pletiv kořene od špičky k bázi umožnila zmapovat, jak se postupně snižuje propustnost apoplastu kořene pro pohyb látek v radiálním směru (od povrchu ke střednímu válci). Se zvyšující se vzdáleností od kořenové špičky klesá v endodermální vrstvě počet propustných buněk, zvyšuje se množství buněk v sekundárním a terciálním stádiu a také roste množství buněk s lignifikovanou buněčnou stěnou. Obdobně tak i u vrstvy exodermis dochází postupně k omezení apoplastického transportu tvorbou Casparyho proužků a následně ukládáním suberinové lamely a k postupnému ukládání sekundárních buněčných stěn. Uložení sekundárních BS je typické pro většinu epifytických orchidejí, na rozdíl od terestrických druhů, u kterých bylo častěji pozorováno ukončení vývoje exodermis už ve stádiu Casparyho proužků (Peterson & Enstone, 1996; Moreira & Isaias, 2008; Joca *et al.*, 2017). Rozdíly v postupu diferenciace kořenů tří analyzovaných druhů zde budou podrobněji diskutovány.

Druhy *A. javanica* a *N. spatulata* mají na svém povrchu silný vícevrstevný velamen, jehož buňky záhy po svém vzniku odumírají. U analyzovaných kořenů druhu *V. planifolia* byla pozorována pouze jednovrstevná pokožka v podobě velamenu, což je pro tento rod typické, i když se některé druhy výrazně odlišují v typu tloušťnutí buněčných stěn (Stern & Judd, 1999). U všech tří analyzovaných kořenů druhu *V. planifolia* byly pozorovány silné nelignifikované vnitřní periklinální buněčné stěny bez vnitřní vláknité struktury, podobně jako u jiných druhů rodu *Vanilla* (Stern & Judd, 1999). Toto lokální tloušťnutí buněk velamenu je u epifytických orchidejí spíše atypické. Zatím není známo, zda se velamen zástupců rodu *Vanilla* liší svojí funkcí od velamenu popisovaného u mnoha jiných epifytických druhů (Porembski & Barthlott, 1988). Může se ale také jednat o důsledek odlišného evolučního vývoje, protože rod *Vanilla* patří do jiné podčeledi než ostatní zkoumané epifytické orchideje a epifytismus se u nich zřejmě vyvinul nezávisle (Givnish *et al.*, 2015). Také je možné, že by silnější velamen epifytických druhů (*A. javanica* a *N. spatulata*) mohl být výhodný pro omezení ztrát vody, které pro sekundární hemiepifyt *V. planifolia* nemusí být tolik limitující.

5.1.1 Exodermis

Hodnotíme-li propustnost apoplastu kořene, stupeň diferenciace exodermis je jedním z důležitých parametrů. Zahrnuje přítomnost modifikací buněčné stěny (Casparyho proužků, suberinových lamel a sekundárních stěn) exodermálních buněk, ale i výskyt propustných buněk.

U obou analyzovaných druhů podčeledi *Epidendroideae* (*A. javanica* a *N. spatulata*) byly v exodermis propustné buňky přítomné a odlišovaly se od okolních buněk téže vrstvy svým tvarem a menší velikostí. Tento trend je u exodermis kořenů často uváděn a je jím charakteristická dimorfní exodermis nejen u orchidejí (Oliveira & Sajo, 1999; Moreira & Isaias, 2008). U obou druhů (*A. javanica* a *N. spatulata*) vrstva exodermis diferencovala do sekundárního či terciálního stádia vždy ve stejné pozici jako vrstva endodermis, přestože exodermis většinou diferencuje ve starší části kořene než endodermis (Enstone *et al.*, 2002). U druhu *A. javanica* vývoj exodermální vrstvy dokonce i částečně předcházela vývoji endodermis. Například v pozici P1 byly u endodermis pozorovány Casparyho proužky a jen malé množství buněk se suberinovou lamelou, zatímco všechny buňky vrstvy exodermis (kromě propustných buněk) již měly uloženy suberinové lamely. Urychlení diferenciace exodermis, tedy přechod buněk do pokročilejších stádií blíže kořenové špičky, může záviset na nedostatku vody, snížení rychlosti růstu kořene nebo může být druhově specifické (Perumalla & Peterson, 1986; Soukup *et al.*, 2002). Konstitutivně rychlejší diferenciace exodermis oproti endodermis byla pozorována např. u mokřadních rostlin, což koresponduje s jejím významem v ochraně kořene při růstu v zaplaveném substrátu (Soukup *et al.*, 2002).

U druhu *V. planifolia* byl pozorován značně pomalejší postup diferenciace exodermis než u druhů podčeledi *Epidendroideae*. U jednoho kořene dokonce exodermální buňky nedošly do terciálního stádia ani u kořenové báze a setrvaly v sekundárním stádiu, a to i přesto, že se jednalo o kořen narostlý do délky 15 cm. Tento druh se také od předchozích dvou odlišoval typem ztlustliny sekundárních BS. Jak u endodermálních, tak u exodermálních buněk byly pozorovány U-ztlustliny typické pro terestrické i vzdušné kořeny rodu *Vanilla* (Stern & Judd, 1999), které nelignifikovaly. Naopak u druhů *A. javanica* a *N. spatulata* se nacházely lignifikované O-ztlustliny. Přítomnost lignifikované exodermis, stejně tak lignifikované endodermis, je podle autorů Moreira & Isaias (2008) jedním ze zásadních předpokladů pro epifytický způsob života. Přítomnost ligninu podporuje funkci apoplastické bariéry, zajišťuje ochranu proti nadměrné evaporaci a zároveň může ovlivňovat vstup houbových hyf mykobionta (Sanford & Adanlawo, 1973; Peterson & Enstone, 1996; Moreira & Isaias, 2008). Zástupci rodu *Vanilla* jsou považováni (i přes nejasnosti v terminologii) za tzv. sekundární hemiepifyty, jejichž kořeny rostou značně do délky a rostlina díky nim zůstává ve spojení se substrátem (Zotz *et al.*, 2013). Je tedy možné, že se rozdílné životní strategie u *Vanilloideae* a *Epidendroideae* odrážejí ve struktuře kořenů a míře lignifikace endodermis a exodermis. V případě, že zástupci

rodu *Vanilla* preferují kontakt se substrátem, absence lignifikace buněčných stěn buněk velamenu a exodermis by pro ně byla pravděpodobně výhodná pro snazší vstup mykobionta.

Vstup mykobionta může být teoreticky regulován právě množstvím propustných buněk (Esnault *et al.*, 1994; Kottke *et al.*, 2010). Propustné buňky však nebyly u *V. planifolia* ve vrstvě exodermis ve starších částech kořene pozorovány. V případě, že se buňky exodermis nacházely v terciálním stádiu (měly uložené sekundární BS), nebyly pozorovány žádné buňky, které by se velikostí, tvarem a odlišným stupněm diferenciací odlišovaly od ostatních buněk této vrstvy. Absence propustných buněk ve starších částech kořene by mohla znemožnit vstup mykobionta, nicméně je otevřenou otázkou, zda u kořenů nepřichycených k podkladu může ke vstupu mykobionta vůbec dojít. V této práci byly analyzovány pouze kořeny nepřichycené k podkladu, a i tak byly na řezech kořeny *V. planifolia* v pozici P1 byly pozorovány pelotony (smotky hyf typické pro orchideoidní mykorhizu) (Hadley *et al.*, 1971; Rasmussen & Rasmussen, 2009). U jiných zde zkoumaných druhů žádné mykorhizní struktury pozorovány nebyly. Ve zmíněné pozici P1 byly u *V. planifolia* všechny buňky exodermis ve stádiu, kdy ještě není možné detekovat Casparyho proužky pomocí histochemického barvení.

Při kontaktu vzdušných kořenů epifytických orchidejí i sekundárních hemiepifytů rodu *Vanilla* s pevným podkladem dochází k tvorbě kořenových vlásků, přičemž může dojít i k zanoření kořene do substrátu a jeho přeměně na terestrickou formu (Benzing, 1990; Stern & Judd, 1999). Zatímco v případě epifytických *Epidendroideae* se zpravidla jedná o menší množství nepřilís větvených kořenů zanořených do porostů jiných epifytických organismů, v případě rodu *Vanilla* zpravidla dochází k bohatému větvení kořene zanořeného do půdy, který může v půdě vytvořit rozsáhlý kořenový systém. V této fázi by tedy zástupci rodu *Vanilla* nemuseli přijímat vodu a živiny celým povrchem kořene ale pouze tou částí, která je v kontaktu se substrátem. Ve starších částech kořene by tak mohlo dojít k diferenciaci všech buněk vrstvy exodermis do terciálního stádia, což odpovídá mému pozorování absence propustných buněk exodermis ve starších částech kořene *V. planifolia*. Odpovídalo by to také velké variabilitě mezi třemi zkoumanými kořeny *V. planifolia*, která může být způsobena odlišnou rychlostí růstu kořenů, které budou svou hlavní funkci plnit až později po dosažení substrátu. Rozdíly mezi dvěma druhy z podčeledi *Epidendroideae* a *V. planifolia* z podčeledi *Vanilloideae* by nicméně mohly být také prostým důsledkem odlišného evolučního vývoje, protože obě skupiny se v evoluci oddělily již ve svrchní křídě a epifytický způsob života u nich vzniknul nezávisle (Givnish *et al.*, 2015).

5.1.2 Endodermis

Podobně jako u exodermis, byl i u vrstvy endodermis druhu *V. planifolia* pozorován pomalý postup diferenciacie. Zatímco už v pozici P1 měly kořeny *A. javanica* a *N. spatulata* v endodermis vyvinuté Casparyho proužky a u některých buněk i suberinové lamely, buňky endodermis *V. planifolia* měly v této pozici pouze primární buněčné stěny bez modifikací. Méně pokročilý stupeň diferenciacie endodermis byl patrný ve všech analyzovaných pozicích kořenů tohoto druhu. Výraznější byl nicméně u druhého a třetího kořene, které byly výrazně kratší než první kořen (15 a 13 cm).

Druhy *A. javanica* a *N. spatulata* se od sebe odlišovaly množstvím propustných buněk endodermis ve starších částech kořenů, kdy u *A. javanica* bylo vyšší procentuální zastoupení těchto buněk než u *N. spatulata*. U druhu *V. planifolia* bylo procentuální zastoupení propustných buněk i u báze kořenů ještě vyšší než u předchozích dvou druhů. Tento rozdíl odpovídá rozdílným strategiím pro zvýšení efektivity absorpce vody a živin, které představili autoři Joca *et al.* (2017) ve své studii. Podle jejich výsledků epifytické orchideje preferují buďto silnější velamen nebo vyšší množství propustných buněk endodermis spolu s vyšším množstvím xylémových/floémových pólů (Joca *et al.*, 2017). Silnější velamen může zajistit vyšší příjem, delší dobu zadržení vody a živin a nižší ztráty, naopak investice do propustných buněk může být cesta k rychlejšímu toku do celé rostliny, ke kterému přispívá i jejich často pozorovaná blízkost s xylémovými póly (Zotz & Winkler, 2013; Joca *et al.*, 2017). Tato rozdílná preference je patrná při porovnání *V. planifolia* s ostatními dvěma druhy nikoli však při porovnávání *A. javanica* a *N. spatulata* mezi sebou, protože *A. javanica* měla značně vyšší množství vrstev velamenu a zároveň i vyšší procentuální zastoupení propustných buněk endodermis než *N. spatulata*.

5.1.3 Střední válec

Z analýzy postupu diferenciacie středního válce byla opět patrná podobnost vývoje kořenů *A. javanica* a *N. spatulata*. U všech analyzovaných kořenů těchto dvou druhů došel vývoj oblasti dřene a buněk okolo CS v posledních dvou pozicích (P3 a P4) do stádia uložení výrazných sekundárních buněčných stěn, které lignifikovaly. Naopak u druhu *V. planifolia* byl patrný opožděný postup diferenciacie obou těchto oblastí v porovnání s předchozími druhy. U kořenové báze (pozice P4) *V. planifolia* byly v oblasti dřene pozorovány tenkostěnné nelignifikované buňky. Výrazná odlišnost středního válce kořenů *V. planifolia* (*Vanilloideae*) od ostatních dvou zkoumaných druhů podčeledi *Epidendroideae* by mohla, podobně jako

ostatní odlišnosti, souviset s jejich odlišným evolučním vývojem. Zároveň se ale může jednat o adaptaci k odlišným životním strategiím, jako v případě exodermis. Opožděná diferenciaci středního válce by mohla ve spojení s větším množstvím propustných buněk endodermis umožnit rychlejší tok látek do xylému a kompenzovat tak tenký velamen. Může se ale také jednat o strategii výhodnou pro kořeny, jejich finální funkce má být terestrická.

Vzorec diferencování celého kořene byl u všech tří druhů podobný. Oblast dřene vždy diferencovala později než oblast buněk okolo pólů CS. To může souviset s pozorovaným vývojem endodermis a exodermis, který ukázal, že kořeny postupně od špičky k bázi omezovaly apoplastický transport, a to výrazně už od vrstvy exodermis v oblasti hned za kořenovou špičkou. U druhu *V. planifolia* byl transport apoplastem omezen až ve větší vzdálenosti od kořenové špičky, nicméně vzorec diferencování kořene byl podobný. Publikované práce se bohužel nezabývají gradientem diferenciaci kořene, nicméně sklerenchymatická struktura středního válce byla pozorována u mnoha epifytických orchidejí (Stern, 2014; Thangavelu & Ayyasamy, 2017; Thangavelu & Muthu, 2017; Muthukumar & Shenbagam, 2018).

5.2 Chloroplasty

Skutečnost, že se chloroplasty přirozeně ve vzdušných kořenech orchidejí vyskytují, je poměrně dlouho známa (Erickson, 1957; Benzing *et al.*, 1983; Kwok-ki *et al.*, 1983; Stern, 2014). Před touto diplomovou prací nicméně nebyly publikovány žádné studie zabývající se podrobně ať už přesnou lokalizací chloroplastů v kořenech orchidejí nebo přímo jejich ultrastrukturou. V pracích, které zmiňují pozorování chloroplastů v kořenech je zpravidla uváděno, že byly chloroplasty pozorovány v primární kůře (Stern, 2014). Existuje ale několik málo prací, které uvádí jejich výskyt i v oblasti středního válce (Goh *et al.*, 1983, Benzing, 1990, Ponert *et al.*, 2016). Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že výskyt chloroplastů ve středním válci je ale u epifytických orchidejí spíše pravidlem než výjimkou. U všech analyzovaných druhů orchidejí z podčeledi *Epidendroideae* se v kořenech vyskytovaly chloroplasty a byly lokalizovány jak v primární kůře, tak ve středním válci. U dvou podrobněji analyzovaných druhů (*A. javanica* a *N. spatulata*) byly chloroplasty pozorovány ve všech pozicích kořene od špičky k bázi.

Chloroplasty ve zkoumaných kořenech vykazovaly při kvalitativním hodnocení nápadné odlišnosti, které byly výrazně větší mezi primární kůrou a středním válcem než mezi jednotlivými chloroplasty v rámci těchto částí kořenů. Chloroplasty v primární kůře kořenů

měly u všech analyzovaných druhů relativně vyšší množství přitíštěných thylakoidů oproti chloroplastům z oblasti středního válce. Rozdílné množství přitíštěných thylakoidů jako důsledek odlišné ozářenosti rostliny bylo pozorováno u různých rostlinných druhů a nedávno i v listech orchidejí (Lichtenthaler, 2013; Shao *et al.*, 2014). Výsledky autorů ukázaly, že v listech vyvíjejících se pod nízkou ozářeností došlo k tvorbě masivních gran oproti listům vystaveným vysoké ozářenosti. Pokud by stejně reagovaly chloroplasty kořenů, dalo by se předpokládat, že chloroplasty ve středním válci budou mít větší množství přitíštěných thylakoidů v granech než chloroplasty v primární kůře, jelikož střední válec je v kořeni hlouběji. Pozorovaný rozdíl v množství přitíštěných thylakoidů je ale opačný, takže pravděpodobně nebude způsoben potenciálním nedostatkem světla ve středním válci.

Velké množství přitíštěných thylakoidů v primární kůře by ale samo o sobě mohlo odpovídat pletivu s nízkým přísunem světla. V tomto směru je zajímavé porovnání s výsledky měření poměru chlorofylu a a chlorofylu b v kořenech různých epifytických orchidejí, které v naprosté většině případů ukázalo nízký poměr chlorofylu a k chlorofylu b, odpovídající adaptaci na zastínění (Martin *et al.*, 2010 a citace uvnitř). V případě kořenů by mohl způsobit výrazné omezení dopadajícího záření na chloroplasty v primární kůře velamen nebo vrstva exodermis. Bylo pozorováno, že velamen může stínit UV záření (Chomicki *et al.*, 2015), a je dobře známé, že v mokřém stavu propouští výrazně více světla, než v suchém stavu (Dycus & Knudson, 1957), nicméně exaktní informace o jeho propustnosti pro vlnové délky fotosynteticky aktivní radiace chybí. Velamen byl u všech analyzovaných druhů podčeledi *Epidendroideae* vícevrstevný. Na druhou stranu druh *V. planifolia* (*Vanilloideae*) měl pouze jednovrstevnou rhizodermis a v chloroplastech primární kůry byly také pozorovány chloroplasty se značně vysokým množstvím přitíštěných chloroplastů. Bohužel u tohoto druhu nebylo možné porovnat jejich ultrastrukturu s chloroplasty středního válce, a to z důvodu, že ve středním válci kořene zpracovaného pro analýzu na TEM nebyly pozorovány žádné chloroplasty (viz dále).

5.2.1 Obsah škrobu v chloroplastech

Samotné zastínění primární kůry velamenem či exodermis však nemůže vysvětlit rozdíly ve struktuře chloroplastů mezi primární kůrou a středním válcem. Vysvětlení těchto rozdílů je na základě dostupných dat obtížné až nemožné, nicméně dostupnost světla zde může hrát určitou roli. O možné úloze endodermis kořenů orchidejí ve stínění světla sice taktéž chybí informace, ale je pravděpodobné, že pokud světlo stíní, tak ho ve středním válci bude méně než

v primární kůře. Ve zkoumaných kořenech jsem zpravidla pozorovala výrazně vyvinutou suberinizovanou endodermis a zároveň chloroplasty v silně sklerifikovaných a lignifikovaných buňkách středního válce. Polymery buněčných stěn, jako například lignin, přitom mají schopnost zachycování určitých vlnových délek světla (Sadeghifar & Ragauskas, 2020), takže je pravděpodobné, že dojde přinejmenším k modifikaci spektra světla a pravděpodobně i k jeho nižší celkové dostupnosti ve vnitřních částech kořene.

Potenciální omezení dostupnosti světla v oblasti středního válce by mohlo být promítnuto například do přítomnosti škrobu, kdy u chloroplastů vystavených nízké ozáření bývá pozorováno jeho nižší množství (Lichtenthaler, 2013). Z kvalitativní analýzy ultrastruktury chloroplastů vyplynulo, že všechny pozorované chloroplasty z oblasti středního válce obsahují relativně nižší množství škrobu než chloroplasty v primární kůře. Výjimkou byly druhy *A. javanica*, u kterého nebyla pozorována škrobová zrna na žádném řezu chloroplastem a *Cleisostoma yersinii*, u kterého byla pozorována masivní škrobová zrna v buňkách dřene. U chloroplastů ve středním válci byla škrobová zrna pozorována pouze u pěti druhů podčeledi *Epidendroideae* a jednalo se (až na výjimku *C. yersinii*) téměř vždy o škrobová zrna, která měla na řezu velice malý průměr a nikdy nebyla pozorována u všech chloroplastů. Jejich výskyt v této oblasti byl tedy spíše výjimečný. Naopak v chloroplastech v primární kůře byla škrobová zrna patrná na řezu téměř vždy, a i jejich velikost byla na řezu relativně větší. Značně nižší množství škrobu v chloroplastech středního válce by tedy mohlo odpovídat nižší dostupnosti světla pro tuto oblast, a tedy i nižší fotosyntetické aktivitě chloroplastů.

U druhů *Andinia longiserpens* a *Porroglossum lorenae* byly pomocí TEM pozorovány v buňkách primární kůry chloroplasty s velkými škrobovými zrny, která na řezu zabírala velkou část chloroplastu. Zároveň byly pozorovány neobvyklé necelistvé plastidy s masivními škrobovými zrny. Při větším zvětšení bylo v detailech patrné, že se okolo těchto masivních zrn v některých plastidech nachází thylakoidy a někdy byla pozorována i grana a plastoglobuly, takže je možné, že se jedná o chloroplasty poškozené při přípravě vzorků na TEM. Zároveň při analýze těchto dvou druhů na epifluorescenčním mikroskopu byla pozorována v primární kůře červená autofluorescence při excitaci modrým světlem, což reflektuje přítomnost chlorofylu, tedy chloroplastů. Pozorování takto enormních škrobových zrn je typičtější u amyloplastů a mohlo by se tedy jednat o nějakou fázi rediferenciace chloroplastů na chloro-amyloplasty (Lichtenthaler, 2013) či amyloplasty. Tato přeměna ale dosud nebyla podrobně popsána a není jasné, zda mohou být takové přechodné formy plastidů časově stálé. Zatím je podrobně zdokumentována opačná světlem indukovaná přeměna

amyloplastů na chloroplasty, a to u hlíz brambor (Zhang *et al.*, 2020). U orchidejí by se přeměna chloroplastů na amyloplasty dala pravděpodobně pozorovat při detailní analýze vzdušných kořenů, které se při zanořování do substrátu mění na terestrickou formu (Benzing, 1990).

Značná podobnost zmíněných dvou druhů může být způsobena jejich příbuzností, jelikož oba jsou řazeny do stejného subtribu *Pleurothallidinae*, který vznikl před zhruba 20 miliony let (Pérez-Escobar *et al.*, 2017). Podobná masivní škrobová zrna či amyloplasty byly nicméně v primární kůře vzdušných kořenů pravděpodobně pozorovány i autory Moreira *et al.* (2008) u druhů *Dichaea cogniauxiana* (subtribus *Zygopetallinae*) a *Epidendrum secundum* (subtribus *Laeliinae*). Bohužel ve studii nejsou žádné snímky z TEM, ale pouze řezy pozorované ve světelném mikroskopu obarvené Lugolovým činidlem.

Pozoruhodné je, že podobná masivní škrobová zrna nebo možná některé stádium rediferenciace chloroplastu, bylo v této diplomové práci pozorováno také ve středním válci jednoho druhu ze zcela jiné skupiny orchidejí, *Cleisostoma yersinii* z tribu *Vandaeae*, přičemž jiné, blíže příbuzné, druhy takové plastidy vůbec neobsahovaly. Ve středním válci druhu *C. yersinii* se však tyto zvláštní plastidy vyskytovaly spolu s klasickými chloroplasty s velkými škrobovými zrny a pouze nepřítisťenými thylakoidy. Taková ultrastruktura je typická například pro chloroplasty pochev cévních svazků u C4 rostlin, které obsahují oproti chloroplastům v mezofylových buňkách škrob a agranální thylakoidy (Mai *et al.*, 2020). U *C. yersinii* však chloroplasty v primární kůře obsahovaly podobně velká škrobová zrna, takže podobnost s chloroplasty C4 rostlin bude spíše náhodná. Thylakoidy se díky velkým škrobovým zrnům obtížně hodnotily, ale na rozdíl od chloroplastů středního válce byly spíše granální.

Přítomnost škrobu téměř ve všech pozorovaných chloroplastech primární kůry kořenů může tedy být nejen zásadním dokladem jejich fotosyntetické aktivity, ale možná i jedním z dále využitelných znaků pro určení převažujícího typu fixace CO₂ v kořenech. V listech rostliny akumulují škrob v chloroplastech během dne jako produkt fotosyntetické asimilace uhlíku (tzv. asimilační škrob; ang. *transitory starch*) (Mitsui *et al.*, 2010; Weise *et al.*, 2011). U C3 rostlin je dnes dobře popsána jeho syntéza během dne a mobilizace (štěpení) během noci. U obou fází se jedná o poměrně složitý proces vyžadující zapojení mnoha enzymů (Mitsui *et al.*, 2010; Weise *et al.*, 2011). I přes značné nejasnosti výsledků z různých metod detekce typů metabolismu je za nejčastější typ fixace CO₂ v kořenech epifytických orchidejí považován CAM metabolismus (Goh *et al.*, 1983; Hew & Yong, 2004; Martin *et al.*, 2010; Kerbauy *et al.*, 2012). U CAM rostlin bylo demonstrováno, že degradace asimilačního škrobu je stejně důležitá

jako u C3 rostlin a dále je zde pravděpodobně zásadní pro tvorbu fosfoenolpyruvátu (PEP), primárního akceptoru CO₂ v cytosolu (Neuhaus & Schulte, 1996; Dodd *et al.*, 2002; Ceusters *et al.*, 2019). V nedávné studii autorů Ceusters *et al.* (2019) byla také nastíněna hlavní možná cesta degradace asimilačního škrobu (pro zajištění substrátu na tvorbu PEP) v CAM listech orchideje *Phalaenopsis* “Edessa“ a tato cesta je překvapivě odlišná od degradace asimilačního škrobu u C3 rostlin, a to zejména v zapojení specifických enzymů. V případě, že by se budoucí studie soustředily například na imunolokalizaci nebo monitorování aktivit těchto specifických degradačních enzymů v kořenech orchidejí, mohla by tato cesta vést k objasnění převažujícího typu fixace CO₂ v kořenech. Pro další studie škrobu je ale nutné uvažovat další důležité parametry, jako je zejména doba odběru kořenů, která v této práci uvažována nebyla.

5.2.2 Neznámé organely u druhu *Vanilla planifolia*

U druhu *V. planifolia* nebyly ve středním válci pozorovány pomocí TEM žádné typické chloroplasty i přesto, že u jednoho kořene byla ve světelném mikroskopu pozorována slabá červená autofluorescence v některých buňkách dřevě při excitaci modrým světlem. Autofluorescence chloroplastů byla pozorována ve středním válci i u druhu *V. pompona* nikoli však u druhu *V. madagascariensis*, který měl celý střední válec zcela bez chloroplastů. Tento výsledek je ale částečně v rozporu například se studií Stern & Judd (1999), ve které autoři porovnávali přítomnost chloroplastů ve dřevě u různých druhů z podčeledi *Vanilloideae*. V této studii pozorovali chloroplasty v parenchymatické dřevě druhů *V. pompona*, *V. madagascariensis* a naopak střední válec bez chloroplastů pozorovali u *V. planifolia* (Stern & Judd, 1999). Výskyt chloroplastů by tím pádem mohl být u této podčeledi specifický pro každého jedince.

Na řezech bylo nicméně pomocí TEM u druhu *V. planifolia* pozorováno větší množství neznámých útvarů či organel. Atypickými útvary byly například v průřezu zcela rovnoměrně kulaté útvary bez rozeznatelné vnitřní struktury, které připomínaly nedávno popsané tzv. fenyloplasty. V této práci byly pozorovány u všech tří kořenů a pouze v buňkách středního válce. Fenyloplasty (ang. *phenyloplast*) byly popsány v plodech druhu *V. planifolia* ve studii Brillouet *et al.* (2014). Dle autorů vznikají rediferenciací chloroplastů, která je ve studii zdokumentována a jejich hlavní funkcí je skladování fenolických glukosidů – primárně glukosylovaného prekurzoru vanilinu (Brillouet *et al.*, 2014). Při rediferenciaci dochází dle autorů k rozvolnění původně granálních thylakoidů, vytvoření výrazných čočkovitých až kruhovitých prostor mezi nimi (ang. *loculi*), tvorbě membránových oblastí, ve kterých se

začíná ukládat prekurzor vanilinu a k finální tvorbě zralého fenyloplastu s dvojitou membránou a osmiofilním homogenním obsahem (Brillouet *et al.*, 2014). Vanilin se přirozeně vyskytuje v plodech vanilky právě v konjugované formě (β -D-glukosid), která nevoní do té doby, než se dostane do kontaktu s β -D-glukosidázami, které zajistí jeho uvolnění (Walton *et al.*, 2003). Metodou imunolokalizace pomocí anti- β -glucosidase primární protilátky byl tento enzym lokalizován pouze v těsné blízkosti fenyloplastu a autoři studie předpokládají, že by se mohl nacházet v lumenu mezi dvěma membránami fenyloplastu (Brillouet *et al.*, 2014). Nabízí se tedy možnost využít shodnou primární protilátku na vzorcích kořenů stejného druhu *V. planifolia* a ověřit tak, zda se skutečně i v tomto orgánu může jednat o fenyloplasty. Podobné kulaté útvary bez rozeznatelné vnitřní struktury byly ale pozorovány i u druhu *Andinia longiserpens*, taktéž v buňkách středního válce. Zda se jedná o tytéž organely jako u *V. planifolia* nelze na základě dostupných dat nijak určit. Zajímavé je, že plastidy s velice podobnou ultrastrukturou, jakou jsem pozorovala u druhu *V. planifolia*, byly pozorovány v dužnině plodů pomeranče při dozrávání, kde se pravděpodobně jedná o přechodné stadium při přeměně amyloplastů v chromoplasty (tzv. „immature green (IMG) stage“; Zeng *et al.*, 2015).

Dalšími neznámými organelami v kořenech *V. planifolia* byly pravděpodobně přeměněné chloroplasty, u kterých byly pozorovány hloučky plastoglobulů a thylakoidy pouze na omezeném prostoru v chloroplastu na řezu. Zbytek chloroplastu byl tvořen neznámým homogenním obsahem. Byly také pozorovány organely vyplněné pouze tímto homogenním obsahem, bez thylakoidů a většinou i bez plastoglobulů, které by například mohly být pokročilejším stádiem dosud nepopsané rediferenciace chloroplastů v tyto neznámé organely. U žádného druhu orchidejí zatím ale nebyly žádné podobné organely popsány.

5.3 Ztenčení buněčných stěn ve středním válci

Při analýze středního válce s pomocí TEM byly pozorovány jednoduché ztenčení buněčných stěn s atypickou lokalizací. Tyto jednoduché ztenčení se vyskytovaly v lignifikovaných sekundárních buněčných stěnách sklerifikovaných buněk středního válce a vždy byly v těsném kontaktu s mezibuněčnými prostory (intercelulárami). Právě absence komplementární ztenčení v sousedící buňce je zajímavá, protože jednoduché ztenčení se velmi často vyskytují v páru (tzv. *pit-pair*). Taková struktura je typická například u buněk sklerenchymu a vytváří se obvykle v místech, kde se nachází plasmodesmy. Tím je zajištěna kontinuita symplastického transportu mezi sousedícími buňkami, u nichž dochází k ukládání

sekundární stěny (Esau, 1953; Fahn, 1990). Nicméně jednoduché ztenčeniны pozorované ve středním válci kořenů orchidejí byly orientované do prostoru intercelulár a protoplast buňky je v tomto místě od interceluláry oddělen pouze střední lamelou a patrně velice tenkou vrstvou primární buněčné stěny.

V literatuře jsou podobné struktury popisovány jako tzv. *blind pits* (Esau, 1953; Fahn, 1990) a pod toto označení jsou zahrnovány ztenčeniны sousedící buďto s intercelulárou, s rohem buňky (střední lamelou) nebo slepě s buněčnou stěnou vedlejší buňky (Yang, 1986). Sporadicky byly pozorovány v parenchymatických buňkách dřevných paprsků a sklerenchymatických vlákních krytosemenných dřevin (Yang, 1986; Sano *et al.*, 2008). Jejich funkce zatím nebyly podrobně zkoumány.

Ze 14 analyzovaných druhů však interceluláry mezi buňkami středního válce nebyly pozorovány u všech. U čtyř druhů, konkrétně *D. polybulbon*, *B. biflorum*, *P. lorenae* a *A. longiserpens*, byl střední válec silně sklerifikovaný a interceluláry nebyly pozorovány na žádném z řezů. Pro tyto druhy je společným znakem menší průměr středního válce a zároveň všechny disponují poměrně tenkými a krátkými kořeny ve srovnání s ostatními analyzovanými druhy podčeledi *Epidendroideae*. Absence intercelulár (a zároveň i příslušných ztenčenin) by tedy mohla být spojena s variabilitou ve velikosti kořenů, nicméně v tomto směru nebyly v této práci kořeny kvantitativně hodnoceny. Jediný druh, u kterého byly pozorovány interceluláry bez sousedících ztenčenin byl druh *V. planifolia*. Zde by se opět mohlo jednat o důsledek odlišného evolučního vývoje nebo odlišné životní strategie, podobně, jak je diskutováno v kapitole Diferenciace kořene. Zároveň ale u tohoto druhu nebyly ve středním válci pozorovány jednoznačně fotosynteticky aktivní chloroplasty, což by mohlo naznačovat, že přítomnost ztenčenin sousedících s intercelulárami souvisí s výskytem chloroplastů ve středním válci. U všech druhů, u kterých byly pozorovány ztenčeniны sousedící s intercelulárami, se zároveň vyskytovaly i jednoduché ztenčeniны v páru mezi dvěma sousedícími buňkami, ve kterých byly často pozorovány plasmodesmy.

Kolokalizace intercelulár a ztenčenin může naznačovat jejich možnou funkci. Zdá se pravděpodobné, že systém intercelulár a přilehlých ztenčenin by mohl plnit úlohu ve výměně plynů ve středním válci. Chloroplasty, které byly pozorovány v této oblasti, se vyskytují i ve značně sklerifikovaných a lignifikovaných buňkách, u kterých je průnik plynů skrz silnou buněčnou stěnu limitovaný. Ultrastruktura chloroplastů je přitom dobře vyvinutá, což naznačuje fotosyntetickou aktivitu. Zároveň se dle kvalitativního pozorování jejich výskyt

v této oblasti středního válce nijak výrazně nemění v závislosti na stáří kořene, kdy postupně dochází k vývoji apoplastických bariér a sklerifikaci středního válce. Na základě dostupných dat nelze jednoznačně odhadnout, jak výraznou bariéru představují apoplastické bariéry kořenů orchidejí pro transport plynů. Nicméně, apoplastické bariéry blokují nejen transport roztoků, ale také plynů. Například u mokřadních rostlin bylo pozorováno, že hypodermální apoplastické bariéry mohou velice efektivně bránit ztrátám kyslíku z kořene (Armstrong *et al.*, 2000; Soukup *et al.*, 2007; Kotula *et al.*, 2009) a téměř jisté, že v tom hraje významnou roli suberin (Watanabe *et al.*, 2013; Ejiri & Shiono, 2019). Podobně i diferencovaná vrstva endodermis v hlízkách na kořenech bobovitých rostlin funguje jako efektivní bariéra pro nežádoucí vstup kyslíku do vnitřní oblasti hlízky (Witty *et al.*, 1986; Becana *et al.*, 1995). Lze tedy předpokládat, že transport plynů bude apoplastickými bariérami a sklerifikací středního válce výrazně omezen i v kořenech orchidejí. Ztenčeniny sousedící s intercelulárami by potom mohly být strukturou umožňující průnik plynů do sklerifikovaných buněk. Na druhou stranu je zvláštní, že chloroplasty druhů s tenkými kořeny bez intercelulár vypadají na první pohled velice podobně jako u druhů s tlustšími kořeny, které mají ve středním válci interceluláry i sousedící ztenčeniny.

5.4 Funkce chloroplastů v kořenech orchidejí

Pro úvahy o možné funkci chloroplastů může být zajímavá i samotná existence intercelulár ve středním válci. Pokud totiž mají interceluláry sloužit k výměně plynů buněk středního válce, tak je zcela zásadní otázka, s jakým okolním prostředím tyto buňky plyny vyměňují. Jednak je možné, že by chloroplasty ve středním válci sloužily pouze k refixaci lokálně respirovaného CO₂ a docházelo by tedy pouze k výměně plynů mezi prostory intercelulár a samotnými buňkami. Taková situace by se mohla podobat například tzv. CAM-*idling*, kdy dochází pomocí CAM metabolismu k refixaci CO₂ v orgánech více méně izolovaných od okolního prostředí (Fu & Hew, 1982; Sipes & Ting, 1985). Také je ale možné, že budou buňky středního válce vyměňovat plyny buď s jinými buňkami rostliny nebo s vnějším prostředím.

V radiálním směru je střední válec ohraničen dobře diferencovanou endodermis, kterou interceluláry neprostupují. Pokud uvažíme pravděpodobnou roli apoplastických bariér v blokování difuze plynů (viz výše), tak by mohlo docházet k výměně plynů s buňkami primární kůry především skrze propustné buňky, které se v endodermis nacházely ve všech analyzovaných pozicích. Možnost difuze plynů v axiálním směru se může jevit na první pohled

málo pravděpodobná vzhledem k dlouhé vzdálenosti. Zároveň není známo, zda intercelulární středního válce vytváří kontinuum propojené po celou délku kořene. Tuto možnost však nelze na základě dostupných dat zavrhnout a transport plynů uvnitř těla rostliny na dlouhou vzdálenost by nebyl nic výjimečného. Například aerenchym vodních a mokřadních rostlin může transportovat plyny celým kořenem (Colmer, 2002; Soukup *et al.*, 2007). U prýtlů epifytické orchideje *Oncidium* 'Aloha' bylo pozorováno zajímavé prostorové rozlišení fotosyntézy a s tím související výměna plynů mezi listy a pahlízou pomocí systému aerenchymu okolo cévních svazků (Rodrigues *et al.*, 2013). Limitující kapacita tenkých listů orchideje *Oncidium* 'Aloha' pro skladování organických kyselin je kompenzována přesunem skladování do sukulentních pahlíz krytých kutikulou. V noci v pahlíze probíhá enzymem PEP-karboxylázou fixace CO₂, který pochází z listů i z respirace pahlíz (Rodrigues *et al.*, 2013). Během dne poté probíhá dekarboxylace organických kyselin v pahlízách a transport CO₂ systémem aerenchymu do listů, kde vstupuje do Calvinova cyklu (Rodrigues *et al.*, 2013). V listech této orchideje tak vlastně probíhá C₃ metabolismus, zatímco v pahlízách část CAM související se syntézou a degradací malátu. Podobně jako je zde aerenchym zapojen do výměny plynů mezi dvěma orgány, mohly by intercelulární ve středním válci umožnit výměnu plynů například mezi kořenovou špičkou a staršími částmi kořene, nebo možná i mezi stonkem a kořenem. Tyto možnosti však vyžadují experimentální ověření.

Pokud se vrátíme k hypotetické možnosti výměny plynů radiálním směrem mezi středním válcem a primární kůrou, tak bychom mohli uvažovat o subfunkcionalizaci chloroplastů v těchto dvou oblastech, která by se mohla podobat výše popsané subfunkcionalizaci mezi pahlízami a listy. V tom případě by pozorované rozdíly v ultrastruktuře chloroplastů středního válce a primární kůry měly odpovídat výsledkům imunolokalizace enzymu PEP-karboxylázy, která byla v této práci na kořenech orchidejí provedena zcela poprvé. Předpokládali jsme, že by se enzym PEP-karboxyláza mohl vyskytovat pouze v jedné z těchto oblastí, jako je tomu kromě výše zmíněné orchideje rodu *Oncidium* například také u C₄ rostlin s věčnou (Kranz) anatomíí listu, kde je enzym PEP-karboxyláza přítomný především v mezofylových buňkách a kde se chloroplasty také odlišují svou ultrastrukturou (Sage, 1999; Pengelly *et al.*, 2011). O to zajímavější byl výsledek imunodetekce, kdy byl pozorován u obou druhů orchidejí (*A. javanica*, *N. spatulata*) signál pouze v propustných buňkách exodermis a v buňkách přilehlé vrstvy primární kůry. V žádných jiných částech kořene ani ve středním válci nebyl signál pozorován. Reaktivita primární protilátky anti-PEPC byla ověřena na kukuřici, kde byla podobně jako v jiných studiích PEP-

karboxyláza lokalizována v mezofylových buňkách, ve kterých u C4 rostlin s věčnou anatomíí dochází k primární fixaci CO₂ právě tímto enzymem (Pengelly *et al.*, 2011). Díky této pozitivní kontrole lze pokládat signál v kořenech orchidejí za relevantní, i když je třeba jisté opatrnosti, protože reaktivita primární protilátky detekující PEP-karboxylázu je výrobcem (Agriser) deklarována pro poměrně široké spektrum druhů včetně kukuřice, ale ne konkrétně pro orchideje. Z výsledků lze tedy prozatím uzavřít, že pokud se rozdílná ultrastruktura chloroplastů středního válce a primární kůry odráží v jejich odlišných funkcích, tak se tyto funkce výrazně neliší zapojením enzymu PEP-karboxylázy. Naproti tomu se tím pravděpodobně odlišují funkce chloroplastů povrchových vrstev primární kůry od chloroplastů v hlubších vrstvách.

Pro spekulaci o možném významu pozorované lokalizace enzymu PEP-karboxyláza je potřeba uvažovat o vrstvě exodermis, která může hrát v pokročilejších stádiích vývoje roli výrazné difuzní bariéry (Peterson & Enstone, 1996). Již bylo zmíněno výše, že například u mokřadních rostlin funguje exodermis jako velmi účinná bariéra proti radiálnímu úniku kyslíku z kořene (Armstrong *et al.*, 2000; Soukup *et al.*, 2007; Kotula *et al.*, 2009). K výměně plynů mezi chlorenchymatickými buňkami primární kůry a okolním prostředím (velamenem) tedy může docházet především skrze propustné buňky exodermis. U vzdušných kořenů se na základně dosavadních studií předpokládá, že je zde nejčastějším typem fixace CO₂ CAM metabolismus (Hew & Yong, 2004; Kerbauy *et al.*, 2012), nicméně se zde nachází značné množství otevřených otázek souvisejících s kořenovým CAM metabolismem. Například zatím nebylo objasněno, jakým mechanismem mohou kořeny bez průduchů docílit nízkých ztrát CO₂ při jeho uvolňování z malátu během dne, a proto byl pro CAM v kořenech orchidejí zaveden pojem tzv. astomatální CAM (ang. *astomatal CAM*; Cockburn *et al.*, 1985). Autoři navrhli vysvětlení, že nízké ztráty CO₂ mohou být způsobeny určitou rovnováhou mezi dekarboxylací malátu a refixací enzymem Rubisco (Cockburn *et al.*, 1985). Imunodetekce PEP-karboxylázy v propustných buňkách ale může přinést zcela nový pohled na tuto problematiku. Jestliže je výskyt enzymu PEP-karboxyláza zacílen přímo do propustných buněk a jejich okolí, tedy k místu vstupu plynů do kořene, mohl by v tomto místě hrát důležitou roli v omezení ztrát CO₂ uvolněného při dekarboxylaci malátu. Zároveň spolu se zábranou ztrát CO₂ by PEP-karboxyláza v propustných buňkách mohla provádět primární fixaci CO₂ a radiálně do středu kořene by mohly být poté symplastem transportovány vyprodukované metabolity (např. malát) podobně jako při C4 metabolismu. V tomto případě by se ale také mohla lišit ultrastruktura nejen chloroplastů středního válce a primární kůry, ale i samotné chloroplasty v primární kůře by mohly vykazovat subfunkcionalizaci a s ní spojené odlišnosti v ultrastruktuře. V této práci

nicméně chloroplasty v povrchových vrstvách primární kůry nebyly studovány. Další potřebné informace pro objasnění odlišností ultrastruktury chloroplastů v kořenech by mohla přinést například imunodetekce dalších fotosyntetických enzymů (např. Rubisco či malátdehydrogenáza).

6 Závěr

I když je v literatuře přítomnost chloroplastů ve středním válci vzdušných kořenů popisována zcela výjimečně, jedná se o častý znak. U epifytických orchidejí podčeledi *Epidendroideae* jsem chloroplasty ve středním válci pozorovala u všech zkoumaných druhů, takže jsou tu pravděpodobně spíše pravidlem než výjimkou. U zástupců bazální podčeledi orchidejí *Vanilloideae* tento výskyt nicméně nebyl zcela jednoznačný a pozorování přineslo mnoho otevřených otázek. U této podčeledi jsem chloroplasty ve středním válci pozorovala pouze u některých druhů a je možné, že jejich výskyt zde je u každého jedince či kořene specifický. Kořeny tohoto rodu také obsahovaly neznámé organely, které dosud nebyly v kořenech popsány. Může se dle dostupných studií jednat například o tzv. fenyloplasty ale také třeba o stádia rediferenciace chloroplastů na jiné plastidy.

Kořeny všech zkoumaných orchidejí vytvářejí výrazné apoplastické bariéry, což může chloroplasty středního válce izolovat od primární kůry. Se zvyšující se vzdáleností od kořenové špičky se buňky apoplastických bariér (endodermis, exodermis) rychle vyvíjí do terciálního stádia a pravděpodobně tak zůstává možný transport plynů pouze skrze propustné buňky. Vzorec diferenciaci kořenů je u všech druhů shodný, ale kořeny *V. planifolia* diferencují pomaleji než kořeny zkoumaných druhů podčeledi *Epidendroideae*. Výskyt chloroplastů ve středním válci se pravděpodobně se stářím kořene a s vývojem apoplastických bariér výrazně nemění, což je zajímavé také vzhledem k výrazné sklerifikaci středního válce. Distribuce plynů k chloroplastům v silně sklerifikovaných buňkách by však mohla být umožněna jednoduchými ztenčeninami, které sousedí přímo s intercelulárami. Tyto ztenčeniny jsem pozorovala u řady druhů podčeledi *Epidendroideae*.

Poprvé byl proveden také detailní náhled na ultrastrukturu chloroplastů z oblastí středního válce a primární kůry. Chloroplasty středního válce i primární kůry mají dobře vyvinutou ultrastrukturu, což naznačuje, že by se mohly uplatňovat ve fotosyntéze. I přesto, že bylo provedeno pouze kvalitativní hodnocení, zjistila jsem výrazné rozdíly mezi chloroplasty středního válce a chloroplasty primární kůry, takže je pravděpodobné, že se funkce chloroplastů v těchto dvou oblastech kořene odlišují.

Imunolokalizace fotosyntetického enzymu PEP-karboxyláza odhalila u dvou zkoumaných druhů její specifický lokální výskyt v oblasti propustných buněk exodermis a přilehlých buněk primární kůry. Tento překvapivý výsledek ukazuje, že se nemusí lišit pouze

úloha chloroplastů středního válce od chloroplastů primární kůry, ale mohlo by docházet k subfunkcionalizaci chloroplastů v rámci primární kůry.

Z dosavadních výsledků lze vyvodit, že úloha chloroplastů v oblasti středního válce je patrně odlišná od úlohy chloroplastů v primární kůře, nicméně je potřeba mnoho dalších experimentů pro zodpovězení otázek týkajících se fotosyntézy vzdušných kořenů. V další práci se plánuje zaměřit na optimalizaci zpracovávání vzorků na TEM, která by umožnila v první řadě nezbytné kvantitativní vyhodnocení ultrastruktury chloroplastů, dále na imunodetekci dalších vybraných fotosyntetických enzymů a na biochemické prostudování procesů, které probíhají v různých vrstvách kořene.

7 Literatura

* sekundární citace jsou označeny hvězdičkou

- AIVALAKIS, G.; DIMOU, M.; FLEMETAKIS, E. & DROSSOPOULOS, J. B. (2004). Immunolocalization of carbonic anhydrase and phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Medicago sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 181-186.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 1-20. doi:10.1111/boj.12385
- ARMSTRONG, W.; COUSINS, D.; ARMSTRONG, J.; ... & BECKETT, P. M. (2000). Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 86: 687-703.
- BARBERON, M. & GELDNER, N. (2014). Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. *Plant physiology*, 166: 528-537.
- BARCELÓ, A. R. (1997). Lignification in plant cell walls. *International review of cytology*, 176: 87-132.
- BECANA, M.; MORAN, J. F. & ITURBE-ORMAETXE, I. (1995). Structure and function of leghemoglobins. *An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza)*, 21: 203-208.
- BENZING, D. H.; OTT, D. W. & FRIEDMAN, W. E. (1982). Roots of *Sobralia macrantha* (*Orchidaceae*): structure and function of the velamen-exodermis complex. *American Journal of Botany*, 69: 608-614.
- BENZING, D. H.; FRIEDMAN, W. E.; PETERSON, G. & RENFROW, A. (1983). Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of *Orchidaceae* in the epiphytic biotope. *American Journal of Botany*, 70: 121-133.
- BENZING, D. H. (1987). Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 74: 183-204.
- BENZING, D. H. (1990). *Vascular epiphytes: general biology and related biota*. Ashton, P.S.; Hubbel, S.P.; Janzen, D.H.; Marshal, A.G.; Raven, P.H. & Tomlinson, P.B. (eds), Cambridge University Press, Cambridge, ISBN: 978-0-521-04895-8
- BLACK, C. C. & MOLLENHAUER, H. H. (1971). Structure and distribution of chloroplasts and other organelles in leaves with various rates of photosynthesis. *Plant Physiology*, 47: 15-23.
- BRÉHÉLIN, C.; KESSLER, F. & VAN WIJK, K. J. (2007). Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in plant science*, 12: 260-266.
- BRILLOUET, J. M.; VERDEIL, J. L.; ODOUX, E.; LARTAUD, M.; ... & CONÉJÉRO, G. (2014). Phenol homeostasis is ensured in vanilla fruit by storage under solid form in a new

- chloroplast-derived organelle, the phenyloplast. *Journal of experimental botany*, 65: 2427-2435.
- BRUNDRETT, M. C.; ENSTONE, D. E. & PETERSON, C. A. (1988). A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma*, 146: 133-142.
- BRUNDRETT, M. C.; KENDRICK, B. & PETERSON, C. A. (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, 66: 111-116.
- CARLSWARD, B. S.; STERN, W. L. & BYTEBIER, B. (2006). Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (*Vandaeae*, *Orchidaceae*) with an emphasis on the leafless habit. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151: 165-218.
- CEUSTERS, N.; FRANS, M.; VAN DEN ENDE, W. & CEUSTERS, J. (2019). Maltose processing and not β -amylase activity curtails hydrolytic starch degradation in the CAM orchid *Phalaenopsis*. *Frontiers in plant science*, 10: 1386.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; ... & SCHUITEMAN, A. (2015). An updated classification of *Orchidaceae*. *Botanical journal of the Linnean Society*, 177: 151-174.
- CHOMICKI, G.; BIDEL, L. P. & JAY-ALLEMAND, C. (2014). Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209: 88-94.
- CHOMICKI, G.; BIDEL, L. P.; MING, F.; ... & RENNER, S. S. (2015). The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *New Phytologist*, 205: 1330-1341.
- COCKBURN, W.; GOH, C. J. & AVADHANI, P. N. (1985). Photosynthetic carbon assimilation in a shootless orchid, *Chiloschista usneoides* (DON) LDL: a variant on crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology*, 77: 83-86.
- COLMER, T. D. (2002). Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany*, 91: 301-309.
- CRUZ, R. T.; JORDAN, W. R. & DREW, M. C. (1992). Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiology*, 99: 203-212.
- DODD, A. N.; BORLAND, A. M.; HASLAM, R. P. ... & MAXWELL, K. (2002). Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of experimental botany*, 53: 569-580.

- DYCUS, A. M. & KNUDSON, L. (1957). The role of the velamen of the aerial roots of orchids. *Botanical Gazette*, 119: 78-87.
- EJIRI, M. & SHIONO, K. (2019). Prevention of radial oxygen loss is associated with exodermal suberin along adventitious roots of annual wild species of *Echinochloa*. *Frontiers in plant science*, 10: 254.
- ENSTONE, D. E. & PETERSON, C. A. (1992). The apoplastic permeability of root apices. *Canadian Journal of Botany*, 70: 1502-1512.
- ENSTONE, D. E.; PETERSON, C. A. & MA, F. (2002). Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 335-351.
- ERICKSON, L. C. (1957). Respiration and photosynthesis in *Cattleya* roots. *American Orchid Society Bulletin*, 26: 401-402.
- ESAU, K. (1953). *Plant anatomy*. Published J. Wiley & Sons, INC., New York
- ESNAULT, A. L.; MASUHARA, G. & MCGEE, P. A. (1994). Involvement of exodermal passage cells in mycorrhizal infection of some orchids. *Mycological Research*, 98: 672-676.
- FAHN, A. (1990). *Plant anatomy*. 4th edition, Pergamon Press, Oxford, ISBN 0-08-037490-5
- FARQUHAR, G. D. (1983). On the nature of carbon isotope discrimination in C4 species. *Functional Plant Biology*, 10: 205-226.
- FLOWERS, T. J.; HAJIBAGHERI, M. A. & CLIPSON, N. J. W. (1986). Halophytes. *The quarterly review of biology*, 61: 313-337.
- FREITAG, H. & STICHLER, W. (2000). A remarkable new leaf type with unusual photosynthetic tissue in a central Asiatic genus of *Chenopodiaceae*. *Plant Biology*, 2: 154-160.
- FU, C. F. & HEW, C. S. (1982). Crassulacean acid metabolism in orchids under water stress. *Botanical Gazette*, 143: 294-297.
- GEHRIG, H.; FAIST, K. & KLUGE, M. (1998). Identification of phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in leaf, stem and roots of the obligate CAM plant *Vanilla planifolia* Salib. (*Orchidaceae*): a physiological and molecular approach. *Plant molecular biology*, 38: 1215-1223.
- GILL, A. M. & TOMLINSON, P. B. (1977). Studies on the growth of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) 4. The adult root system. *Biotropica*, 9: 145-155.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; VAN EE, B.; ... & SYTSMA, K. J. (2014). Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in *Bromeliaceae*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 71: 55-78.

- GIVNISH, T. J.; SPALINK, D.; AMES, M.; ... & CAMERON, K. M. (2015). Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282: 20151553.
- GOH, C. J.; AVADHANI, P. N.; LOH, C. S.; ... & ARDITTI, J. (1977). Diurnal stomatal and acidity rhythms in orchid leaves. *New Phytologist*, 78: 365-372.
- GOH, C. J.; ARDITTI, J. & AVADHANI, P. N. (1983). Carbon fixation in orchid aerial roots. *New phytologist*, 95: 367-374.
- HABERLANDT, G. (1914). *Physiological plant anatomy*. Macmillan and Company, limited, London.
- HADLEY, G.; JOHNSON, R. P. C. & JOHN, D. A. (1971). Fine structure of the host-fungus interface in orchid mycorrhiza. *Planta*, 100: 191-199.
- * HÄFLIGER, A. (1901). *Beiträge zur Anatomie der Vanilla-Arten*. Dissertation, Universität Basel, Schwitzerlandt. – in Stern (2014)
- HAYAT, M. A. (2000). *Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications*. Cambridge University Press, 4th edition, ISBN-13: 978-0521632874.
- HELTNE, J. & BONNETT, H. T. (1970). Chloroplast development in isolated roots of *Convolvulus arvensis* (L.). *Planta*, 92: 1-12.
- HEW, C. S.; NG, Y. W.; WONG, S. C.; ... & HO, K. K. (1984). Carbon dioxide fixation in orchid aerial roots. *Physiologia Plantarum*, 60: 154-158.
- HEW, C. S.; NG, C. K. Y.; GOUK, S. S.; ... & WONG, S. C. (1996). Variation in $\delta^{13}\text{C}$ values for different plant parts of an *Oncidium* orchid. *Photosynthetica*, 32: 135–139.
- HEW, C. S. & YONG, J. W. (2004). *The physiology of tropical orchids in relation to the industry*. World Scientific Publishing Company, Singapore, ISBN: 978-981-238-801-8
- HOFSTEDDE, R. G.; WOLF, J. H. & BENZING, D. H. (1993). Epiphytic biomass and nutrient status of a Colombian upper montane rain forest. *Selbyana*, 14: 37-45.
- HOSE, E.; CLARKSON, D. T.; STEUDLE, E.; ... & HARTUNG, W. (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2245-2264.
- HOTHORN, T.; BRETZ, F.; AG, P. & WESTFALL, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50: 346-363.
- IDRIS, N. A. & COLLINGS, D. A. (2019). The Induction and Roles Played by Phi Thickenings in Orchid Roots. *Plants*, 8: 574.
- INAN, G.; ZHANG, Q.; LI, P.; ... & SHI, H. (2004). Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant physiology*, 135: 1718-1737.

- JOCA, T. A. C.; DE OLIVEIRA, D. C.; ZOTZ, G.; ... & MOREIRA, A. S. F. P. (2017). The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption. *Flora*, 230: 66-74.
- JURA-MORAWIEC, J.; MONROY, P.; MARRERO, A. & TULIK, M. (2020). Aerial Root Structure and Its Significance for Function in *Dracaena draco*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40: 486-493.
- KARAHARA, I.; IKEDA, A.; KONDO, T. & UETAKE, Y. (2004). Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta*, 219: 41-47.
- KEDROVSKI, H. R. & SAJO, M. D. G. (2019). What are tilosomes? An update and new perspectives. *Acta Botanica Brasilica*, 33: 106-115.
- KELLY, D. L.; O'DONOVAN, G.; FEEHAN, J.; ... & MARCANO-BERTI, L. (2004). The epiphyte communities of a montane rain forest in the Andes of Venezuela: patterns in the distribution of the flora. *Journal of Tropical Ecology*, 20: 643-666.
- KERBAUY, G. B.; TAKAHASHI, C. A.; LOPEZ, A. M.; ... & MERCIER, H. (2012). Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids: current knowledge, future perspectives. In: *Applied Photosynthesis*. Najafpour M. (ed.), InTech, London, ISBN: 978-953-51-0061-4
- KOTTKE, I.; SUÁREZ, J. P.; HERRERA, P.; ... & GARNICA, S. (2010). Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277: 1289-1298.
- KOTULA, L.; RANATHUNGE, K. & STEUDLE, E. (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.
- KRAUSE, G. H. & WEIS, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology*, 42: 313-349.
- KRESS, W. J. (1989). The systematic distribution of vascular epiphytes. In: *Vascular Plants as Epiphytes. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, Lüttge U. (ed), Springer, Berlin, Heidelberg, ISBN: 978-3-642-74465-5
- KWOK-KI, H.; HOCK-HIN, Y. & CHOY-SIN, H. (1983). The presence of photosynthetic machinery in aerial roots of leafy orchids. *Plant and cell physiology*, 24: 1317-1321.
- LAWTON, J. R. (1988). Ultrastructure of chloroplast membranes in leaves of maize and ryegrass as revealed by selective staining methods. *New phytologist*, 108: 277-283.
- LICHTENTHALER, H. K. (2013). Plastoglobuli, thylakoids, chloroplast structure and development of plastids. In: *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*, Biswal B., Krupinska K., Biswal U.C. (eds), Springer, Dordrecht, ISBN: 978-94-007-5723-3

- LÍŠKA, D.; MARTINKA, M.; KOHANOVÁ, J. & LUX, A. (2016). Asymmetrical development of root endodermis and exodermis in reaction to abiotic stresses. *Annals of botany*, 118: 667-674.
- LERMAN, J. C. (1975). How to Interpret Variations in the Carbon Isotope Ratio of Plants: Biologic and Environmental Effects. In: *Environmental and Biological Control of Photosynthesis*, Marcelle R. (ed), Springer, Dordrecht, ISBN: 978-94-010-1957-6
- LUX, A.; LUXOVÁ, M.; ABE, J. & MORITA, S. (2004). Root cortex: structural and functional variability and responses to environmental stress. *Root Research*, 13: 117-131.
- LÜTTGE, U. (1987). Carbon dioxide and water demand: crassulacean acid metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in ecophysiological work. *New Phytologist*, 106: 593-629.
- MA, J. F.; TAMAI, K.; YAMAJI, N.; ... & YANO, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440: 688-691.
- MAI, K. K. K.; GAO, P. & KANG, B. H. (2020). Electron Microscopy Views of Dimorphic Chloroplasts in C4 Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1020
- MARTIN, C. E.; MAS, E. J.; LU, C. & ONG, B. L. (2010). The photosynthetic pathway of the roots of twelve epiphytic orchids with CAM leaves. *Photosynthetica*, 48: 42-50.
- MERTZ, R. A. & BRUTNELL, T. P. (2014). Bundle sheath suberization in grass leaves: multiple barriers to characterization. *Journal of experimental botany*, 65: 3371-3380.
- MEYER, C. J.; SEAGO JR, J. L. & PETERSON, C. A. (2009). Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of Botany*, 103: 687-702.
- MITSUI, T.; ITOH, K.; HORI, H. & ITO, H. (2010). Biosynthesis and degradation of starch. *Bull Facul Agric Niigata Univ*, 62: 49-73.
- MIYAMOTO, N.; STEUDLE, E.; HIRASAWA, T. & LAFITTE, R. (2001). Hydraulic conductivity of rice roots. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1835-1846.
- MOREIRA, A. S. F. P. & ISAIAS, R. M. D. S. (2008). Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian archives of biology and technology*, 51: 83-93.
- MOREIRA, A. S. F. P.; DE LEMOS FILHO, J. P.; ZOTZ, G. & DOS SANTOS ISAIAS, R. M. (2009). Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 204: 604-611.
- MOTOMURA, H.; UENO, O.; KAGAWA, A. & YUKAWA, T. (2008). Carbon isotope ratios and the variation in the diurnal pattern of malate accumulation in aerial roots of CAM species of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Photosynthetica*, 46: 531-536.

- MUTHUKUMAR, T. & SHENBAGAM, M. (2018). Vegetative anatomy of the orchid *Bulbophyllum sterile* (Orchidaceae: Epidendroideae). *Lankesteriana*, 18: 13-22.
- NELDER J.A. & WEDDERBURN R.W.M. (1972). Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society*, 135: 370–384.
- NEUHAUS, H. E. & SCHULTE, N. (1996). Starch degradation in chloroplasts isolated from C3 or CAM (crassulacean acid metabolism) – induced *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Biochemical Journal*, 318: 945-953.
- OFFERMANN, S.; OKITA, T. W. & EDWARDS, G. E. (2011). Resolving the compartmentation and function of C4 photosynthesis in the single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. *Plant physiology*, 155: 1612-1628.
- OLIVEIRA, L. (1982). The development of chloroplasts in root meristematic tissue of *Secale cereale* L. seedlings. *New Phytologist*, 91: 263-275.
- OLIVEIRA, V. D. C. & SAJO, M. D. G. (1999). Root anatomy of nine *Orchidaceae* species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42.
- PEARSON, P. N. & PALMER, M. R. (2000). Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. *Nature*, 406: 695-699.
- PENGELLY, J. J.; KWASNY, S.; BALA, S.; ... & VON CAEMMERER, S. (2011). Functional analysis of corn husk photosynthesis. *Plant physiology*, 156: 503-513
- PÉREZ-ESCOBAR, O. A.; CHOMICKI, G.; CONDAMINE, F. L. ... & ANTONELLI, A. (2017). Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids in the world's richest plant biodiversity hotspot. *New Phytologist*, 215: 891-905.
- PERUMALLA, C. J. & PETERSON, C. A. (1986). Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Canadian Journal of Botany*, 64: 1873-1878.
- PERUMALLA, C. J.; PETERSON, C. A. & ENSTONE, D. E. (1990). A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 103: 93-112.
- PETERSON, C. A. & ENSTONE, D. E. (1996). Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum*, 97: 592-598.
- POMAR, F.; MERINO, F. & BARCELÓ, A. R. (2002). O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*, 220: 0017-0028.
- PONERT, J.; TRÁVNÍČEK, P.; VUONG, T. B.; ... & SUDA, J. (2016). A new species of *Cleisostoma* (Orchidaceae) from the Hon Ba Nature Reserve in Vietnam: A multidisciplinary assessment. *Public Library of Science one (PLoS one)*, 11: e0150631.

- POREMBSKI, S. & BARTHLOTT, W. (1988). Velamen radicum micromorphology and classification of *Orchidaceae*. *Nordic Journal of Botany*, 8: 117-137.
- PRIDGEON, A. M.; STERN, W. L. & BENZING, D. H. (1983). Tilosomes in roots of *Orchidaceae*: morphology and systematic occurrence. *American Journal of Botany*, 70: 1365-1377.
- PRIDGEON, A. M. (1987). The velamen and exodermis of orchid roots. In: *Orchid biology. Reviews and perspectives IV.*, Arditti, J. (ed.), Comstock Publishing Associates: Ithaca & London, ISBN: 0-8014-1777-5
- R CORE TEAM (2019). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. Retrieved 19 April 2021.
- RASMUSSEN, H. N. & RASMUSSEN, F. N. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118: 334-345.
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of cell biology*, 17: 208-212.
- RICH, S. M.; LUDWIG, M. & COLMER, T. D. (2008). Photosynthesis in aquatic adventitious roots of the halophytic stem-succulent *Tecticornia pergranulata* (formerly *Halosarcia pergranulata*). *Plant, Cell & Environment*, 31: 1007-1016.
- RODRIGUES, M. A.; MATIZ, A.; CRUZ, A. B.; ... & KERBAUY, G. B. (2013). Spatial patterns of photosynthesis in thin-and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C3 – CAM plasticity in an organ-compartmented way. *Annals of botany*, 112: 17-29.
- ROTH-NEBELSICK, A.; HAUBER, F. & KONRAD, W. (2017). The Velamen Radicum of Orchids: A Special Porous Structure for Water Absorption and Gas Exchange. In: *Functional Surfaces in Biology III*, Gorb S. N. & Gorb E. V. (eds), Springer, Cham, ISBN: 978-3-319-74144-4
- SADEGHIFAR, H. & RAGAUSKAS, A. (2020). Lignin as a UV light blocker – a review. *Polymers*, 12: 1134.
- SAGE, R. F. (1999). Why C4 photosynthesis. In: *C4 plant biology*, Sage, R. F. & Monson, R. K. (eds), Academic Press, San Diego, California, ISBN: 978-0-12-614440-6
- SANFORD, W. W. & ADANLAWO, I. (1973). Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 66: 307-321.
- SANO, Y.; OHTA, T. & JANSEN, S. (2008). The distribution and structure of pits between vessels and imperforate tracheary elements in angiosperm woods. *IAWA journal*, 29: 1-15.
- SEAGO, JR, J. L.; PETERSON, C. A.; ENSTONE, D. E. & SCHOLEY, C. A. (1999). Development of the endodermis and hypodermis of *Typha glauca* Godr. and *Typha angustifolia* L. roots. *Canadian Journal of Botany*, 77: 122-134.

- SHAO, Q.; WANG, H.; GUO, H.; ... & LI, M. (2014). Effects of shade treatments on photosynthetic characteristics, chloroplast ultrastructure, and physiology of *Anoectochilus roxburghii*. *PloS one*, 9: e85996.
- SHARPE, R. M. & OFFERMANN, S. (2014). One decade after the discovery of single-cell C₄ species in terrestrial plants: what did we learn about the minimal requirements of C₄ photosynthesis?. *Photosynthesis research*, 119: 169-180.
- SILVERA, K.; SANTIAGO, L. S. & WINTER, K. (2005). Distribution of crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak and strong modes. *Functional Plant Biology*, 32: 397-407.
- SILVERA, K.; SANTIAGO, L. S.; CUSHMAN, J. C. & WINTER, K. (2009). Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the *Orchidaceae*. *Plant physiology*, 149: 1838-1847.
- SIPES, D. L. & TING, I. P. (1985). Crassulacean acid metabolism and crassulacean acid metabolism modifications in *Peperomia camptotricha*. *Plant Physiology*, 77: 59-63.
- SMITH, J. A. C. & LÜTTGE, U. (1985). Day-night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta*, 163: 272-282.
- SOUKUP, A.; VOTRUBOVÁ, O. & ČÍŽKOVÁ, H. (2002). Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist*, 153: 277-287.
- SOUKUP, A.; ARMSTRONG, W.; SCHREIBER, L.; ... & VOTRUBOVÁ, O. (2007). Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist*, 173: 264-278.
- SOUKUP, A. (2014). Selected simple methods of plant cell wall histochemistry and staining for light microscopy. In: *Plant cell morphogenesis*, Žárský V. & Cvrčková F. (eds) Humana Press, Totowa, NJ, ISBN: 978-1-62703-643-6
- STATA, M.; SAGE, T. L.; RENNIE, T. D.; ... & SAGE, R. F. (2014). Mesophyll cells of C₄ plants have fewer chloroplasts than those of closely related C₃ plants. *Plant, cell & environment*, 37: 2587-2600.
- STERN, W. L. & JUDD, W. S. (1999). Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (*Orchidaceae*). *Botanical journal of the Linnean Society*, 131: 353-382.
- STERN, W. L. (2014). *Anatomy of the monocotyledons volume X: Orchidaceae*. Gregory, M. & Cutler, D.F. (eds), OUP Oxford, Oxford, ISBN: 978-0-19-968907-1
- SUI, X.; SHAN, N.; HU, L.; ... & ZHANG, Z. (2017). The complex character of photosynthesis in cucumber fruit. *Journal of experimental botany*, 68: 1625-1637.

- SZAREK, S. R.; JOHNSON, H. B. & TING, I. P. (1973). Drought adaptation in *Opuntia basilaris*: significance of recycling carbon through crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology*, 52: 539-541.
- SZCZEPANIK, J. & SOWIŃSKI, P. (2014). The occurrence of chloroplast peripheral reticulum in grasses: a matter of phylogeny or a matter of function? *Acta physiologiae plantarum*, 36: 1133-1142.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M. & MURPHY, A. (2015). *Plant physiology and development*, 6th edition, Sinauer Associates Incorporated, ISBN: 9781605353265
- THANGAVELU, M. & AYYASAMY K. (2017). Comparative anatomy of aerial and substrate roots of *Acampe praemorsa* (Rox.) Blatt. & McCann. *Flora*, 226: 17-28.
- THANGAVELU, M. & MUTHU, S. (2017). Vegetative anatomical adaptations of *Epidendrum radicans* (Epidendroideae, Orchidaceae) to epiphytic conditions of growth. *Modern Phytomorphology*, 11: 117-130.
- TROUGHTON, J. H. (1979). $\delta^{13}\text{C}$ as an indicator of carboxylation reactions. In: *Photosynthesis II*, Gibbs M. & Latzko E. (eds), Springer, Berlin, Heidelberg, ISBN: 978-3-642-67242-2
- TUKEY, J. W. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, 5: 99-114.
- UENO, O. (1998). Immunogold localization of photosynthetic enzymes in leaves of various C4 plants, with particular reference to pyruvate orthophosphate dikinase. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1637-1646.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; PYANKOV, V. I. & EDWARDS, G. E. (1999). Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe *Salsoleae* (Chenopodiaceae). *Journal of experimental botany*, 50: 1779-1795.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; KIIRATS, O. & EDWARDS, G. E. (2001). Kranz anatomy is not essential for terrestrial C4 plant photosynthesis. *Nature*, 414: 543-546.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; FRANCESCHI, V. R.; CHUONG, S. D. & EDWARDS, G. E. (2006). Functional characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C4 leaf anatomy: immuno-, cytochemical and ultrastructural analyses. *Annals of Botany*, 98: 77-91.
- VOZNESENSKAYA, E. V.; AKHANI, H.; KOTEYEVA, N. K.; ... & EDWARDS, G. E. (2008). Structural, biochemical, and physiological characterization of photosynthesis in two C4 subspecies of *Tecticornia indica* and the C3 species *Tecticornia pergranulata* (Chenopodiaceae). *Journal of Experimental Botany*, 59: 1715-1734.

- WALTON, N. J.; MAYER, M. J. & NARBAD, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63: 505-515.
- WATANABE, K.; NISHIUCHI, S.; KULICHIKHIN, K. & NAKAZONO, M. (2013). Does suberin accumulation in plant roots contribute to waterlogging tolerance? *Frontiers in Plant Science*, 4:178.
- WEISE, S. E.; VAN WIJK, K. J. & SHARKEY, T. D. (2011). The role of transitory starch in C3, CAM, and C4 metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. *Journal of experimental botany*, 62: 3109-3118.
- WHATLEY, J. M. & GUNNING, B. E. S. (1981). Chloroplast development in *Azolla* roots. *New Phytologist*, 89: 129-138.
- WIESNER, J. (1878). Note über das Verhalten des Phloroglucius und einerer verwandter Körper zur verholzten Zellmembran. *Sitzungsber Akad Wiss Wien, Math-Naturwiss KI, Abt 2B*, 77: 60-66.
- WINTER, K.; WALLACE, B. J.; STOCKER, G. C. & ROKSANDIC, Z. (1983). Crassulacean acid metabolism in Australian vascular epiphytes and some related species. *Oecologia*, 57: 129-141.
- WINTER, K.; MEDINA, E.; GARCIA, V.; ... & MUNIZ, R. (1985). Crassulacean Acid Metabolism in Roots of a Leafless Orchid, *Campylocentrum tyrridion* Garay & Dunsterv. *Journal of plant physiology*, 118: 73-78.
- WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R.; SKØT, L. & SHEEHY, J. E. (1986). Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford surveys of plant molecular and cell biology*, 3: 275-314.
- YANG, K. C. (1986). The ultrastructure of pits in *Paulownia tomentosa*. *Wood and Fiber Science*, 18: 118-126.
- ZENG, Y.; DU, J.; WANG, L. ... & DENG, X. (2015). A comprehensive analysis of chromoplast differentiation reveals complex protein changes associated with plastoglobule biogenesis and remodeling of protein systems in sweet orange flesh. *Plant physiology*, 168: 1648-1665.
- ZHANG, H.; ZHAO, Z.; SONG, B.; ... & LIU, X. (2020). Light-induced ultrastructure changes of amyloplasts and effect of nitrogen fertilization on greening in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 168: 111275.
- ZOTZ, G. & ZIEGLER, H. (1997). The occurrence of crassulacean acid metabolism among vascular epiphytes from Central Panama. *New Phytologist*, 137: 223-229.
- ZOTZ, G. (2013). The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171: 453-481.
- ZOTZ, G. & WINKLER, U. (2013). Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*, 171: 733-741.

ZOTZ, G. (2016). *Plants on plants – the biology of vascular epiphytes*. Springer International Publishing, Switzerland, ISBN: 978-3-319-39237-0