

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyziologie rostlin**

**Ultrastruktura a fotochemické charakteristiky  
chloroplastů kukuřice seté (*Zea mays* L.) pod  
vlivem zaplavení**

**Hana Červinková**

**Diplomová práce**

**Praha 2007**



***Diplomovou práci jsem zpracovávala na katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty UK v Praze v letech 2003 – 2007 pod vedením doc. RNDr. Jaromíra Kutíka.***

***Práce je součástí výzkumného záměru MSM0021620858 - Signalizace a molekulární mechanismy buněčné odpovědi ve spolupráci s kolektivem RNDr. Marie Kočové z katedry genetiky a mikrobiologie Přf UK.***

***Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím materiálů uvedených v seznamu literatury. Souhlasím se zapůjčováním své diplomové práce ke studijním účelům.***

***V Praze 27.4.2007***

  
**Hana Červinková**

*Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Jaromíru Kutíkovi, CSc. za laskavé a trpělivé vedení práce, RNDr. Marii Kočové, CSc. a RNDr. Daně Holé, Ph.D. z katedry genetiky a mikrobiologie PŘF UK za neocenitelné rady a připomínky, Ing. Miloslavu Doubkovi z pracoviště elektronové mikroskopie Státního zdravotního ústavu v Praze za milou spolupráci a Prof. Nicolettě Rascio z Univerzity v Padově (Itálie) za možnost pracovat v její laboratoři.*

*V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a všem mým blízkým za všestrannou podporu během studia i během vypracování této práce.*

# Abstract

## Ultrastructure and photochemical characteristics of maize (*Zea mays* L.) chloroplasts under influence of root flooding

The aim of my diploma work was to evaluate the influence of hypoxic and posthypoxic stress on photosynthetic apparatus. Maize (*Zea mays* L.) of two genotypes was chosen as experimental plant. The genotype 2023 had better growth fitness, the CE704 was of worse fitness. On young maize plants, experiments were performed imposing hypoxic stress by flooding of root system and then posthypoxic stress after transfer of experimental plants into optimal cultivation conditions.

Morphological and physiological characteristics of the plants, quantity of photosynthetic pigments, photochemical activities of isolated chloroplasts (photosystem II activity as a Hill reaction activity, photosystem I activity) and especially ultrastructure of chloroplasts in leaf mesophyll cells (using transmission electron microscopy and stereology) were followed.

Roots of experimental maize plants (33 days after sowing) were flooded in pots during 9 days (hypoxic stress, A). Control plants were during that period watered optimally, other cultivation conditions (daylength, temperature) were the same for both groups of plants. 20 days after transfer of flooded plants into optimal cultivation conditions, both groups of plants (experimental and control) were tested again for posthypoxic stress (B). The experiment had two independent repetitions (I. and II.). Mature, not more growing leaves were used as the source of experimental material (coleoptile was leaf 0, 4. leaf was used for IA and IIA, 5. leaf was used for IB and IIB, for chloroplast ultrastructure study was also 4. leaf used for IB and IIB).

The results showed that the reaction of maize plants on the flooding stress depended considerably on their genotype and even on experimental series. The quantity of chlorophylls and carotenoids in the leaves declined under hypoxic and posthypoxic stress as compared with control, usually significantly. The ratio of chlorophylls to carotenoids was always lower under stress than in control plants. AHR per leaf area unit or per dry mass unit did not differ significantly between stressed and control plants, but AHR per chlorophyll quantity unit was higher in stressed plants, mostly significantly. It seemed that photosystem II was more effective under stress. The differences in photosystem I activity between stressed and control plants were mostly not significant. There were also mostly not significant differences only between both groups of plants in specific leaf mass and their relative water content.

Concerning chloroplasts ultrastructure, there was higher volume density (relative partial volume in chloroplast) of granal and intergranal thylakoids, harbouring photochemical reactions, in II. than in I. experimental series. However, the influence of hypoxic as well as posthypoxic stress on thylakoid volume density was mostly not significant in both series (more thylakoids under posthypoxic stress as compared with control for genotype 2023 in II. series was an exception). In plastoglobules, lipoid substances from thylakoid membranes accumulate during leaf senescence or under stress conditions. In CE704 genotype, it was significantly higher volume density of this compartment under stress conditions comparing with control, more considerably under posthypoxic stress than under hypoxic one – stress and leaf ageing probably summed up here. In 2023 genotype, situation was the same as in I. series, but in II. series, the difference was not significant under hypoxia, and significant, but in reverse

sense under posthypoxia (more plastoglobules in control plants). Also chloroplasts shape was with various significance influenced by cultivation conditions, the chloroplasts were usually more flat under stress conditions.

It is possible to summarize, that root flooding influenced the photosynthetic apparatus of maize, however not very strongly and unambiguously. The quantities of photosynthetic pigments in the leaves were most affected, the activity of photosystems and chloroplast ultrastructure was influenced less.

# **OBSAH**

## **Seznam použitých zkratek**

### **1. Úvod**

<b>2. Přehled literatury</b> .....	11
2.1. Plastidy.....	11
2.1.1. Klasifikace plastidů.....	11
2.1.2. Ultrastruktura chloroplastů.....	12
2.1.2.1. Chloroplasty C <sub>3</sub> rostlin.....	14
2.1.2.2. Chloroplasty C <sub>4</sub> rostlin.....	14
2.2. Fotosyntéza.....	15
2.3. Stres a typy stresorů.....	18
2.4. Stres zaplavením.....	19
2.4.1. Hypoxie a anoxie.....	19
2.5. Změny v půdě při zaplavení.....	20
2.5.1. Fyzikální změny v půdě.....	20
2.5.2. Změny v zastoupení mikroorganismů.....	21
2.5.3. Chemické změny.....	21
2.6. Změny v rostlinném těle vyvolané hypoxií/anoxií.....	23
2.6.1. Anatomické a morfologické adaptace a ovlivnění růstu.....	23
2.6.2. Tvorba aerenchymu.....	25
2.6.3. Vliv na ultrastrukturu buněk.....	26
2.6.4. Vliv na mitochondrie a dýchání.....	28
2.6.5. Vliv na plastidy a fotosyntézu.....	30
2.7. Posthypoxický/postanoxický stres.....	33
2.8. Vliv hypoxie/anoxie kořenového systému na ultrastrukturu, složení a funkce chloroplastů.....	34
2.9. Cíle diplomové práce.....	36
<b>3. Materiál a metody</b> .....	37
3.1. Rostlinný materiál a jeho kultivace.....	37
3.2. Morfologické a fyziologické charakteristiky rostlin.....	40
3.2.1. Měření morfologických parametrů a vzhled rostlin.....	40
3.2.2. Stanovení RWC (relativního obsahu vody) v listech.....	40
3.2.3. Specifická hmotnost listu a obsah pigmentů.....	40
3.3. Měření fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů.....	41
3.4. Stanovení obsahu chlorofylu v suspenzích izolovaných chloroplastů.....	42
3.5. Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii.....	43
3.6. Transmisní elektronová mikroskopie.....	44
3.7. Stereologie.....	45
3.8. Statistické zpracování dat.....	46
<b>4. Výsledky</b> .....	48
4.1. Charakteristiky růstových podmínek a morfologické charakteristiky a vzhled rostlin.....	48
4.1.1. Charakteristiky růstových podmínek.....	48
4.1.2. Morfologické charakteristiky a vzhled rostlin.....	52
4.2. Funkční fotosyntetické charakteristiky chloroplastů.....	55

4.3. Ultrastrukturní charakteristiky chloroplastů.....	71
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>81</b>
5.1. Morfologické charakteristiky a vzhled rostlin.....	81
5.2. Specifická hmotnost listu a funkční fotosyntetické charakteristiky chloroplastů.....	82
5.3. Ultrastrukturní charakteristiky chloroplastů.....	87
5.4. Závěr diskuze.....	89
<b>6. Souhrn.....</b>	<b>92</b>
<b>7. Seznam citované literatury.....</b>	<b>94</b>
<b>8. Přílohy.....</b>	<b>99</b>



# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AHR	aktivita Hillovy reakce
ATP	adenosintrifosfát
BSC	buňky pochvy cévního svazku
C <sub>3</sub> /C <sub>4</sub>	rostliny vykazující C <sub>3</sub> /C <sub>4</sub> typ fotosyntézy
CAM	rostliny vykazující CAM typ fotosyntézy
DCMU	3-(3',4'-dichlorfenyl)-1,1 -dimetylmočovina
DCPIP	2,6-dichlorfenolindofenol
Chl <i>a</i>	chlorofyl <i>a</i>
Chl <i>b</i>	chlorofyl <i>b</i>
Kar	karotenoidy
LHC	světlosběrný komplex fotosystému I nebo fotosystému II
MC	buňky mezofylu
NAD-ME	NAD-malátový enzym, typ C <sub>4</sub> fotosyntézy
NADP-ME	NADP-malátový enzym, typ C <sub>4</sub> fotosyntézy
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
P	plastoglobuly
PEP	fosfoenol pyruvát
PEP-CK	PEP-karboxykináza, typ C <sub>4</sub> fotosyntézy
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
RWC	relativní obsah vody
ROS	aktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
Rubisco	ribulóza – 1,5 – bisfosfátkarboxyláza - oxygenáza
SpHm	specifická hmotnost
TC	tylakoidy celkově
TG	tylakoidy granální
TI	tylakoidy intergranální
Tris-HCl	tris(hydroxymetyl)-aminometan

# 1. ÚVOD

Během svého života se rostliny setkávají s různými vnějšími faktory. Ty mohou ovlivňovat jejich život buď příznivě nebo nepříznivě. Jedním z významných stresů ovlivňujících rostliny je i hypoxický stres v přírodě většinou vyvolaný zaplavením substrátu, ve kterém rostliny rostou. Stresu zaplavením jsou rostliny běžně vystavovány např. po dlouhotrvajících deštích, zejména na půdním podloží obsahujícím velké množství jílové složky, které zabraňuje dostatečně rychlému vsakování povrchové vody, nebo při jarním tání, kdy jsou spodní vrstvy půdy ještě zmrzlé a povrchová voda se opět nemůže dostatečně rychle vsakovat. K posthypoxickému stresu dochází po „opadnutí“ vody.

Jedním z nejcitlivějších systémů k působení stresů je fotosyntetický aparát rostlin – především chloroplasty. Strukturální změny chloroplastů (změny velikosti, tvaru, objemu, struktur membránového systému, objemové hustoty plastoglobulů a škrobových inkluzí) jsou spojeny se změnami ve funkční aktivitě světelných a temnotních fází fotosyntézy (změny v reakčních centrech fotosystémů, v absorpci světelného záření fotosyntetickými pigmenty, v elektronovém transportu a další).

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) patří mezi nejvýznamnější kulturní plodiny pěstované v České republice (po pšenici a cukrové řepě). Patří mezi rostliny s C<sub>4</sub> typem fotosyntézy, u nichž došlo k prostorovému oddělení primární a sekundární fixace CO<sub>2</sub>. Rostliny s tímto typem fotosyntézy se staly oblíbeným pokusným materiálem.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na hodnocení morfologických a fyziologických charakteristik rostlin, fotochemických aktivit izolovaných chloroplastů, aktivity PSII (AHR) a aktivity PSI, a zejména ultrastruktury chloroplastů v buňkách mezofylu u kukuřice seté (*Zea mays* L.) dvou genotypů, lépe rostoucího genotypu 2023 a hůře rostoucího genotypu CE704. Rostliny byly hodnoceny na konci devítidenního hypoxického stresu a po dalších dvaceti dnech pěstování v optimálních růstových podmínkách, tedy za posthypoxického stresu.

Je překvapivé, že o takto komplexní hodnocení vlivu hypoxického a posthypoxického stresu na fotosyntetický aparát při zaplavení kořenů se ještě nikdo, pokud je mi známo, nepokoušel.

## **2. PŘEHLED LITERATURY**

Většina rostlin patří mezi autotrofní organizmy, které získávají energii potřebnou ke svému životu ze záření (fotoautotrofie). To je možné díky tomu, že se u těchto organismů vyvinul způsob jak přeměnit sluneční záření na energii uloženou v chemických vazbách – pomocí fotosyntézy (reakční děj) a plastidů (struktury ve kterých dochází k tomuto ději).

Během svého života se rostliny setkávají s různými vnějšími i vnitřními faktory. Ty mohou ovlivňovat jejich život buď příznivě nebo nepříznivě. V extrémních případech mohou zavinit i smrt rostliny (v lepším případě ireverzibilně poškodit její orgány). Tyto faktory negativně ovlivňující rostlinu se nazývají stresové faktory neboli stresory.

### **2.1. Plastidy**

Plastidy jsou typické rostlinné buněčné organely a především organely fotosyntézy. Spolu s mitochondriemi patří mezi organely semiautonomní. Plastidová DNA kóduje nanejvýše 10% plastidových bílkovin (např. velká podjednotka Rubisca, bílkoviny reakčních center fotosystémů I a II), zbývajících 90% je kódováno jadernou DNA (malá podjednotka Rubisca, enzymy biosyntézy karotenoidů, bílkoviny LHC obou fotosystémů a mnoho dalších).

#### **2.1.1. Klasifikace plastidů**

Plastidy můžeme dělit podle jejich schopnosti fotosyntetizovat na fotosynteticky aktivní (chloroplasty) a na fotosynteticky neaktivní (leukoplasty, chromoplasty; Hudák 1997). Nejznámější klasifikace je však založena na rozdílné barvě plastidů (Kutík a Beneš 1991). Nebarevné plastidy mají slaběji vyvinutý membránový systém. Jsou to leukoplasty, které můžeme dále dělit podle typu zásobních látek, které se v nich hromadí na: amyloplasty, proteinoplasty a elaioplasty. Hudák *et al.* (1983) řadí mezi leukoplasty i proplastidy. Za nedostatku světla se u většiny zelených rostlin vyvíjejí etioplasty. Různé typy plastidů jsou vzájemně přeměnitelné podle cyklického

schématu, které navrhli Thomson a Whatley (1980). Fotosyntéza zelených rostlin probíhá v chloroplastech.

### 2.1.2. Ultrastruktura chloroplastů

Chloroplasty patří mezi nejstudovanější plastidy, viz z posledních let monografie Biswal *et al.* (2003), Wise a Hooper (2006), a v dospělosti mají složitou submikroskopickou strukturu. Chloroplasty mají většinou čočkovitý až bochníčkovitý tvar. Jejich průměr je pět až deset  $\mu\text{m}$ . Jejich tvar se mění jak v průběhu ontogeneze, mladé chloroplasty jsou plošší a během vývoje dochází k zakulacování (Kutík 1998), tak v závislosti na množství slunečního záření, na světle se zplošťují a ve tmě se naopak zakulacují. Chloroplasty nezaujímají v buňce stálé místo, ale pohybují se v závislosti na množství a typu dopadajícího záření. K těmto pohybům dochází v nástěnné vrstvě cytoplazmy (respektive v její vnitřní části endoplazmě) pomocí cytoskeletárního komplexu. Při dlouhovlnném či slabém ozáření jsou chloroplasty umístěny u stěn kolmých k dopadajícímu záření (epistrofe nebo diastrofe) a při krátkovlnném či silném ozáření jsou umístěny u stěn rovnoběžných se směrem dopadajícího záření (parastrofe; Kutík 1985, Kutík a Beneš 1991). Ve tmě je rozmístění chloroplastů v buňce náhodné.

Chloroplast se skládá ze stromatu a dvou obalových membrán. Vnější obalová membrána je snad původem od hostitele a je propustná i pro velké molekuly. V posledních letech se však objevil názor, že obě obalové membrány chloroplastu pocházejí z cyanobakteriálního symbionta a že hostitelská membrána zanikla ve fylogenezi. Vnitřní obalová membrána pochází od endosymbionta a je specificky propustná (volně propustná pro  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , nepropustná pro ATP). Tloušťka jednotlivých membrán je šest až deset nm a jsou navzájem odděleny periplastidovým prostorem. Vzdálenost obou membrán je asi 20 nm. Membrány se mezi sebou liší ve složení i ve funkci, ale obě obsahují karotenoidy, které chrání chlorofyly před fotooxidací. Vnější membrána působí především jako fyzická bariéra. Z vnitřní membrány je odvozen vnitřní membránový systém - tylakoidy a periferní retikulum.

Periferní retikulum je typické pro rostliny s  $\text{C}_4$  fotosyntézou a nejvyvinutější je u dospělých listů. Je to složitý systém měchýřků a kanálků nacházející se v periferní

oblasti chloroplastu a slouží k transportu produktů fotosyntézy z chloroplastu do cytosolu. U rostlin s C<sub>3</sub> fotosyntézou není tato struktura příliš vyvinuta.

Systém tylakoidů tvoří ploché váčky vyplněné tekutou fází (lumen). Tyto váčky tvoří buď nepřitisknuté (intergranální) nebo přitisknuté (granální) tylakoidy. Granum může být tvořeno dvěma nebo více plochými vaky tylakoidů. Jednotlivá grana jsou vzájemně propojena intergranálními tylakoidy, které jsou protáhlé a úzké (Hudák *et al.* 1983). Předpokládá se, že chloroplast obsahuje pouze jediný tylakoid, který je bohatě rozvětvený. Systém tylakoidů je velmi dynamická struktura. Stupeň přitisknutí jednotlivých tylakoidních membrán je ovlivněn například koncentrací Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> iontů, konformačními změnami membránových bílkovin nebo spektrem pigmentů vyskytujících se v chloroplastu. Fotosystémy tylakoidních membrán přeměňují zářivou energii v chemickou.

Jednotlivé struktury fotosystémů jsou umístěny specificky buď v granálních nebo intergranálních tylakoidech, čímž je dosaženo optimální distribuce energie mezi fotosystémem pomalým (PSII) a rychlým (PSI). PSI absorbující v dlouhovlnější oblasti záření by jinak mohl získávat excitační energii i z PSII. V intergranálních tylakoidech se převážně vyskytuje PSI a LHCI, kdežto PSII a LHCII se vyskytují převážně v tylakoidech granálních. Ostatní tylakoidní komplexy se vyskytují v granálních /intergranálních membránách buď v závislosti na své morfologické stavbě nebo na funkční spojitosti s jednotlivými fotosystémy.

Vnitřek chloroplastů je vyplněn stromatem (matrix). Ve stromatu probíhají sekundární procesy fotosyntézy a dochází zde k replikaci, transkripci a translaci chloroplastové DNA. Dále zde dochází k redukci nitrátů, transaminaci a částečně i k asimilaci síry (Kutík a Beneš 1991, Hudák 1997). Ve stromatu se nachází enzymy Calvinova cyklu, mikrotubulární struktury (udržují tvar chloroplastů a podílejí se na jejich dělení), různé typy inkluzí (škrobové, bílkovinné), ribozomy, dvouvláknová kruhová DNA vyskytující se v mnoha kopiích, plastoglobuly a někdy i shluky fytoferritinu. Fytoferritin je bílkovina vázající železo a sloužící pravděpodobně k uchování dostatečného množství Fe v netoxické formě, jako zásoba k možnému pozdějšímu využití. Může se vyskytovat u všech plastidů s výjimkou fotosynteticky vysoce aktivních. V chloroplastech je pozorován jako elektrondenzní struktura. Škrobové inkluze jsou tvořeny nejen směsí amylozy a amylopektinu (glukanové polymery), ale také proteiny a lipidy. Chloroplastové škrobové inkluze jsou menší, než škrobové inkluze vyskytující se v jiných (především zásobních) plastidech.

Plastoglobuly se vyskytují ve všech typech plastidů. Jejich rozměr se zvětšuje v souvislosti s ontogenezí chloroplastů. Dochází v nich k ukládání nově nasyntetizovaných lipidů, ale také lipidů pocházejících z odbourávání tylakoidních membrán. I jejich struktura a četnost se mění v závislosti na stupni ontogenetického vývoje a na typu plastidu ve kterém se nacházejí.

### **2.1.2.1. Chloroplasty C<sub>3</sub> rostlin**

Fotosyntéza C<sub>3</sub> rostlin probíhá především v listovém mezofylu, nejčastěji v palisádových a houbových buňkách. Jako první stabilní produkt karboxylace ribulózo-1,5-bisfosfátu vznikají tříuhlíkaté sloučeniny, které daly název této skupině rostlin. Rostliny s C<sub>3</sub> fotosyntézou mají v celém listu uniformně vypadající chloroplasty. Ty obsahují stroma ve kterém se nachází enzym ribulóza bisfosfát karboxyláza/oxygenáza (Rubisco). Ve stromatu probíhají sekundární reakce fotosyntézy. Reakční centra fotosystému II se nacházejí v membránách granálních tylakoidů. Grana jsou velká a skládají se z mnoha na sebe přiložených tylakoidů. Reakční centra fotosystému I se nacházejí v membránách intergranálních tylakoidů a na okraji gran. Škrobová zrna se vyskytují častěji v houbových buňkách mezofylu, než v buňkách palisádových.

### **2.1.2.2. Chloroplasty C<sub>4</sub> rostlin**

Fotosyntéza C<sub>4</sub> rostlin je odvozenějším typem fixace oxidu uhličitého. Probíhá zde série reakcí v cytoplazmě, mitochondriích a chloroplastech a také transport intermediálních produktů mezi intercelulárními kompartmenty i mezi sousedními buňkami. Z těchto důvodů mají rostliny s C<sub>4</sub> fotosyntézou specifickou anatomii listu i ultrastrukturu chloroplastů. Typickou rostlinou je např. kukuřice, cukrová třtina, čirok. U těchto rostlin se vyskytují dvě různá pletiva obsahující dimorfní chloroplasty – vnější mezofyl (mesophyll cells, MC) a vnitřní buňky pochev cévních svazků (bundle sheath cells, BSC). Chlorenchym je uspořádán věčtitě ve dvou soustředných vrstvách okolo vaskulárního pletiva cévních svazků – „Kranz Anatomie“. Tato listová anatomie byla poprvé popsána Haberlandtem v roce 1904 (Hudák 1997). MC a BSC chloroplasty se liší nejen ultrastrukturou, ale také genovou expresí.

Mezofylové chloroplasty C<sub>4</sub> rostlin mají stejnou ultrastrukturu jako chloroplasty C<sub>3</sub> rostlin a obvykle neobsahují škrobové inkluze. BSC chloroplasty mají ultrastrukturu odlišnou, která je dále specifická pro každou podskupinu. Tyto chloroplasty obsahují velké množství škrobových inkluzí. Stěny BSC buněk jsou silné a obsahují minimum intercelulár, ale jsou s MC buňkami propojeny četnými plazmodezmy. Stěny buněk na rozhraní mezi parenchymatickou pochvou a mezofylem vytvářejí silnou suberinovou lamelu, která představuje bariéru pro CO<sub>2</sub>, který je uvolňován při dekarboxylaci. Suberinové lamely také pravděpodobně zabraňují ztrátám sacharózy z cévních svazků (Evert *et al.* 1996).

V podskupině PEP-CK (fosfoenolpyruvátkarboxykinaza) obsahují chloroplasty BSC grana a jsou umístěny centrifugálně. K dekarboxylaci zde dochází v mitochondriích, ale také v cytoplazmě.

V podskupině NAD-ME obsahují chloroplasty BSC četná grana, která jsou dobře vyvinutá a jsou umístěny centripetálně. K dekarboxylaci zde dochází v mitochondriích. Do této podskupiny patří např. merlík nebo proso.

V podskupině NADP-ME jsou chloroplasty BSC téměř agranální a jsou umístěny centrifugálně. Intergranální tylakoidy jsou převážně dlouhé a jsou uspořádány rovnoběžně s povrchem chloroplastu. K dekarboxylaci zde dochází v chloroplastech. Do této podskupiny patří důležité plodiny např. cukrová třtina, kukuřice nebo čirok.

## 2.2. Fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších dějů probíhajících na naší planetě, viz např. Nátr (1998), Lawlor (2001). Při tomto souboru reakcí dochází k syntéze energeticky bohatých organických sloučenin (sacharidů) z jednoduchých látek anorganických (CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O) s využitím energie slunečního záření. Fotosyntézu lze popsat jako sled reakcí při kterých dochází k přenosu vodíku z donoru na akceptor. Akceptorem je nejčastěji CO<sub>2</sub>. Fotosyntéza může být buď kyslíková nebo bezkyslíkatá (bakteriální). Dále bude popisována pouze fotosyntéza kyslíková.

Pomocí sumární chemické rovnice lze její reakce vyjádřit následovně:



Fotosyntéza probíhá v chloroplastech za účasti fotosyntetických barviv. Fotosyntetické děje můžeme rozdělit na primární (světelné) a na sekundární (temnotní). Mezi primární děje řadíme pohlcení fotonu, fotolýzu vody, oddělení elektrických nábojů, přenos elektronů proti spádu potenciálu, vytvoření protonového gradientu, redukci NADP a syntézu ATP. Tyto reakce probíhají v tylakoidních membránách. Mezi sekundární děje řadíme procesy spojené s fixací CO<sub>2</sub> a vznikem sacharidů. Tyto reakce probíhají ve stromatu chloroplastů. Za katalýzy enzymem Rubisco je CO<sub>2</sub> vázán na ribulóza-1,5-bisfosfát. CO<sub>2</sub> je u všech rostlin asimilován v Calvinově cyklu. Na tuto reakci navazuje syntéza mnoha organických sloučenin. Fotosyntéza je inhibována kyslíkem, což je důsledek oxygenázové aktivity enzymu Rubisco. Na oxygenázovou aktivitu Rubisca navazují další reakce vyúsťující ve fotorespiraci.

Během evoluce se vyvinuly tři různé způsoby fixace CO<sub>2</sub>. Podle nich rozdělujeme vyšší rostliny do tří skupin.

### 1) C<sub>3</sub> rostliny

V chloroplastech C<sub>3</sub> rostlin dochází k fixaci CO<sub>2</sub> na pětiuhlíkaté sloučeniny. Prvním produktem této fixace jsou dvě tříuhlíkaté sloučeniny, kyselina 3-fosfoglycerová. Proto označení C<sub>3</sub> rostliny. U těchto rostlin snižuje fotorespirace rychlost fotosyntézy. Z tohoto typu fotosyntézy se během evoluce vyvinuly další dva typy. Do této skupiny patří většina cévnatých rostlin, z kulturních plodin např. *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa* atd..

### 2) C<sub>4</sub> rostliny

C<sub>4</sub> fotosyntéza vznikla jako adaptace rostlin na suché klima s vysokými nočními i denními teplotami. Mezi zástupce této skupiny patří např. *Zea mays*, *Amaranthus retroflexus*, *Panicum maximum* atd.. Vyznačuje se prostorovým oddělením primární fixace CO<sub>2</sub> od sekundární fixace v Calvinově cyklu. K fixaci CO<sub>2</sub> dochází v cytozolu buněk mezofylu na tříuhlíkatou sloučeninu kyselinu 3-fosfoenolpyrohroznovou (PEP). Navázáním O<sub>2</sub> na PEP vzniká čtyřuhlíkatá kyselina oxaloctová. Proto označení C<sub>4</sub> rostliny. V buňkách BSC dochází k dekarboxylaci a CO<sub>2</sub> je reasimilován Rubiscem. Výsledkem je potlačení fotorespirace. Rostliny s C<sub>4</sub> fotosyntézou dělíme podle enzymů katalyzujících dekarboxylační reakce a podle lokalizace dekarboxylace do tří podskupin.



### 1. NADP-ME typ

NADP-malátový typ je nejběžnějším typem C<sub>4</sub> fotosyntézy. Transportní sloučeninou je malát, enzymem katalyzujícím dekarboxylaci je NADP malátový enzym a k této reakci dochází v chloroplastech BSC. Mezi typické zástupce rostlin s tímto podtypem fotosyntézy řadíme např. *Zea mays*, *Saccharum officinarum*, *Sorghum bicolor*, *Portulaca grandiflora* atd..

### 2. NAD-ME typ

U NAD-malátového typu je transportní sloučeninou aspartát, enzymem katalyzujícím dekarboxylaci je NAD malátový enzym a k této reakci dochází v mitochondriích BSC.

### 3. PEP-CK typ

U PEP-karboxykinázového typu může být transportní sloučeninou malát i aspartát, enzymem katalyzujícím dekarboxylaci je PEP karboxykináza a k této reakci dochází v cytoplazmě nebo v mitochondriích BSC.

## **3) CAM rostliny**

CAM (Crassulacean Acid Metabolism) typ fotosyntézy byl poprvé pozorován u čeledi *Crassulaceae* a odtud získal tento typ fotosyntézy svůj název. U CAM došlo k časovému oddělení karboxylace a dekarboxylace. Primární fixace CO<sub>2</sub> probíhá v noci, zatímco dekarboxylace a sekundární karboxylace probíhají ve dne při zavřených průduších. CAM typ fotosyntézy je způsobem adaptace na extrémně suchá stanoviště s vysokými nočními i denními teplotami. Typickými zástupci této skupiny jsou sukulentní rostliny, např. zástupci rodu *Crassula* a dále *Liliaceae*, *Bromeliaceae*, *Orchideaceae* atd..

Efektivita dílčích fotosyntetických dějů je závislá nejen na typu a aktuálním stavu rostliny (druh rostliny, stáří, genotyp), ale je také ovlivňována faktory vnějšího prostředí. Je to především množství dopadajícího záření, dostupnost CO<sub>2</sub>, vody a minerálních látek (Šesták 1985).

### 2.3. Stres a typy stresorů

Působení stresorů vyvolává stres. Na rostlinu během života působí celá řada stresorů a většinou několik stresorů najednou. Za určitých podmínek nemusejí environmentální faktory způsobit stresovou reakci, ale jejich různé kombinace mohou pro rostlinu vytvořit stresující prostředí. Proto je i definice stresoru nejednoznačná. Biswal a Biswal (1999) ho definují jako biotický nebo abiotický faktor, který brání rostlinám v normálním fungování a vyúsťuje v redukci jejich růstu a reprodukce. Jeden faktor může vyvolávat odlišné reakce v závislosti na okolním prostředí a aktuálním stavu rostliny. Různé stresory mohou vyvolávat obdobné či shodné obranné reakce. Proto je studium těchto dějů velmi komplikovanou problematikou.

Stresory můžeme dělit na biotické a abiotické. Mezi **biotické stresory** patří interakce mezi rostlinami a jinými organizmy (herbivorie, vliv patogenů - houby, viry, bakterie), vzájemné ovlivnění rostlin (parasitismus, alelopatie). K **abiotickým stresorům** patří vlivy neživého vnějšího prostředí na rostliny. Tyto vlivy mohou být **fyzikálního nebo chemického charakteru**.

Mezi **fyzikální stresory** patří omezení výměny plynů, zničení struktury půdy, pohyb vody, mechanické účinky větru, nadměrné ozáření, extrémní teploty (horko, chlad, mráz). Mezi **chemické stresory** patří i dále podrobněji zmiňovaný stres zaplavením způsobující hypoxii až anoxii, stres sucha, stres z nedostatku nebo nadbytku živin, stres z nedostatku nebo nadbytku minerálních živin a přítomnost toxických látek (pevných, rozpuštěných ve vodě nebo plyných).

Rostliny se během evoluce musely s působením stresorů vyrovnat. Obrana proti působení stresoru může být buď pasivní nebo aktivní. Za pasivní obranu lze považovat vytvoření různě účinných ochranných mechanických struktur (impregnace buněčných stěn, zesílená kutikula, rezervoáry vody), nebo úplné vyhnutí se stresu. Toho rostliny dosáhnou přizpůsobením se časovému působení stresoru a optimálním načasováním např. reprodukčních fází (doba opylení, oplození, zrání semen). Za aktivní obranu rostlin považujeme přímou reakci rostliny na aktuální působení stresoru. Tato reakce se nazývá **stresová reakce**. Lze ji charakterizovat několika po sobě jdoucími fázemi. Jsou to poplachová fáze, restituční fáze, otužovací fáze a fáze rezistence. V případě, že stres působí příliš dlouhou dobu nebo je jeho působení příliš

silné, nastává fáze vyčerpání po které může následovat smrt části rostliny nebo rostliny jako celku.

## 2.4. Stres zaplavením

Stres zaplavením patří mezi časté a významné stresy. Při zaplavení je vzduch z půdních prostor vytlačen vodou. Tím se výrazně snižuje difúze plynů. K tomuto ději dochází buď při dlouhodobém působení vody v období záplav, nebo také při krátkodobém podmáčení, např. při oblevách nebo dlouhotrvajících deštích (Čiamporová a Mistrík 1991). V severních oblastech je většina půdy během zimy permanentně pokryta sněhem, ten sám o sobě difúzi plynů nijak nebrání. Při jarním tání však dochází k zaplavení obrovských ploch. Anoxií trpí také rostliny po čas zimy uzavřené v ledu. Dostupnost kyslíku ve vodě je podstatně nižší a rostliny mohou trpět stresem z nedostatku kyslíku (hypoxie), nebo z úplné absence kyslíku (anoxie). V případech, že je půda zcela bez kyslíku, začínají převládat v půdní mikroflóře anaerobní mikroorganismy a redukční reakce. Anaerobní mikroorganismy používají alternativní akceptory elektronů. Výsledkem těchto procesů je hromadění dvojmocného železa, manganu, kyseliny mléčné a máselné a také ovlivnění koloběhu dusíku (Bláha *et al.* 2003). K hypoxii může přispět i nevhodná struktura půdy, teplota, respirační aktivita rostlin, zastoupení a respirační aktivita mikroorganismů žijících v půdě. Nejcitlivější ke stresu zaplavením jsou kořenové buňky. Ke strukturním změnám však dochází i v buňkách koleoptile a listů (Čiamporová a Mistrík 1991). Změny v růstu prýtu se mohou objevit jako výsledek metabolických změn v kořeni. Reakce rostliny závisí na stupni její tolerance k zaplavení. U rostlin které nejsou na hypoxické až anoxické podmínky adaptovány dochází k vážným poškozením. U rostlin tolerantních k zaplavení způsobuje deficience kyslíku přepnutí aerobního metabolismu na metabolismus anaerobní. Ten je však méně efektivní při produkci energie (Wilkinson 1994).

### 2.4.1. Hypoxie a anoxie

Hypoxie je charakterizována sníženou dostupností kyslíku pro rostliny, např. po zaplavení kořenů. Substrát je považován za hypoxický, když se obsah kyslíku

pohybuje pod  $50 \text{ mmol.m}^{-3}$ . K anoxii dochází při úplné absenci kyslíku (např. při zaplavení celé rostliny). Při anoxii nelze kyslík vůbec detekovat (Nilsen a Orcutt 1996). Zaplavená půda však není stejnoměrně zbavena kyslíku (Ponnamperuma 1984). Několik milimetrů silná povrchová vrstva půdy, která je v kontaktu s povrchem vody, obsahuje určité množství kyslíku (hypoxický sediment, Ponnamperuma 1984).

Za anoxických podmínek dochází u některých rostlin již po 24 hodinách k nekróze buněk a po 48 hodinách jsou tyto změny již irreverzibilní. Při obnově, t.j. po skončení anoxických podmínek, se pak nekróza šíří z kořenových špiček i do vlastních kořenů.

Nedostatek kyslíku způsobuje ztrátu metabolické aktivity kořenů, to může prodloužit přežití kořenové osy. Ta se u některých rostlin účastní případné obnovy. Pokud jsou nekrotické části odstraněny, probíhá obnova rychleji. U kukuřice je pericykl základem pro obnovu růstu kořene a je tedy nepostradatelný. U některých genotypů kukuřice se vyskytuje programovaná buněčná smrt buněk kořenových špiček jako mechanismus kontroly tolerance k stresu zaplavením (Subbaiah a Sachs 2003).

## **2.5. Změny v půdě při zaplavení**

Při zaplavení půdy dochází k celé řadě různých chemických, fyzikálních a biologických změn. Ty značně ovlivňují složení půdy a tím i podmínky pro život rostlin. Půdní složení, struktura půdy a délka trvání zaplavení mají značný vliv na následné procesy probíhající v zaplavené půdě.

### **2.5.1. Fyzikální změny v půdě**

V zaplavené půdě jsou půdní prostory vyplněny vodou a tím je omezena difúze plynů. Nedochozí k tak rychlé výměně plynů mezi půdou a atmosférou, jako za běžných podmínek, v důsledku nízké rozpustnosti kyslíku ve vodě. Rychlost difúze většiny plynů je  $10^4$  x vyšší ve vzduchu oproti vodě (Pezeshki 1994, Nilsen a Orcutt 1996). V důsledku omezené difúze plynů se v zaplavené půdě hromadí plyny:  $\text{CO}_2$ , dusík, metan a vodík, které později unikají ve formě bublin (Ponnamperuma 1984). Zaplavení ovlivňuje také množství absorbovaného záření půdou, toky tepla mezi

půdou a atmosférou oběma směry, tepelnou kapacitu půdy a teplotu půdy (Ponnamperuma 1984).

Z kořenové zóny zaplavené půdy se voda dostává pryč evapotranspirací (závisí na aktuálním stavu rostliny), prosakováním a vytékáním (Ponnamperuma 1984). Evaporace z volné vodní hladiny závisí na sluneční energii, teplotě vzduchu, vlhkosti a rychlosti větru. Prosakováním rozumíme pohyb vody směrem dolů v důsledku gravitace, což závisí na textuře půdy. Vytékáním se rozumí horizontální pohyb podpovrchové vody (Ponnamperuma 1984).

### **2.5.2. Změny v zastoupení mikroorganismů**

V důsledku postupného vyčerpání kyslíku dochází v půdě ke změně skladby mikroorganismů. Dochází ke zvýšení počtu anaerobních a fakultativně anaerobních organismů. Ty využívají ve svém energetickém metabolismu jako akceptory elektronů jiné molekuly než kyslík. Hypoxický sediment mohou obývat aerobní bakterie (Nilsen a Orcutt 1984). Vzniká tak aerobně-anaerobní prostředí, které je důležité při přeměnách některých živin.

### **2.5.3. Chemické změny**

Specifická elektrická vodivost vodního roztoku při konstantní teplotě závisí na obsahu iontů v roztoku. V zaplavené půdě je vodivost určena rovnováhou mezi tvorbou a inaktivací popř. přemístěním iontů (Ponnamperuma 1984). Významnými elektrochemickými změnami jsou výrazný pokles redox potenciálu a změny pH (Ponnamperuma 1984). Při zaplavení se mění hodnota pH substrátu v závislosti na charakteru zaplavené půdy. Když je zaplavena půda kyselá - pH stoupá, zatímco pH klesá v případě zaplavení alkalické půdy (Ponnamperuma 1984).

Míra redukce daných látek je dána hodnotou jejich standardního elektrodového potenciálu (při pH=7). Má-li elektrodový potenciál kladné znaménko tj. látka má vyšší afinitu k elektronům než vodík, přijme elektron a samovolně se redukuje. Jestliže má látka znaménko záporné tj. má nižší afinitu k elektronům než vodík, poskytne tento elektron a sama se oxiduje. Nejvyšší hodnotu má  $O_2$  (+0,82V, Vodrážka 1982), proto je redukován nejdříve a to na vodu v procesu aerobní respirace (Ponnamperuma

1984). Když je kyslík vyčerpán dochází k redukci dalších látek. Anaerobní bakterie využívají jako akceptory elektronů různé chemické sloučeniny. Při denitrifikaci redukují anaerobní bakterie  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{N}_2$ . Meziproduktem této reakce je  $\text{NO}_2^-$ . Dále anaerobní bakterie redukují hydroxidy železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na rozpustné železnaté sloučeniny ( $\text{Fe}^{2+}$ ), oxidy manganu ( $\text{Mn}^{4+}$ ) na volné manganaté ionty ( $\text{Mn}^{2+}$ ), oxid siřičitý ( $\text{SO}_2$ ) na  $\text{H}_2\text{S}$  a oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ) na metan ( $\text{CH}_4$ ). Podle aktuálního redox potenciálu naměřeného v půdě lze určit jaké mikroorganismy v ní žijí a jaké elektrochemické děje v ní probíhají. Metabolické aktivity mikroorganismů ovlivňují dostupnost minerálních živin pro rostliny, ale také přítomnost těžkých kovů v půdě. Při redox potenciálu přibližně + 220 mV a při pH=7 klesá dostupnost nitrátu ( $\text{NO}_3^-$ ) k nule, při + 200 mV vznikají redukované formy manganu ( $\text{Mn}^{2+}$ ), při + 120 mV vznikají rozpustné  $\text{Fe}^{2+}$ , při -150 mV se začíná tvořit  $\text{H}_2\text{S}$  a při -250 mV  $\text{CH}_4$  (Ponnamperuma 1984).

V zaplavené půdě dochází k velmi pomalému rozkládání organického materiálu ve srovnání s rychlostí rozkladu v dobře provzdušněné půdě. Také konečné produkty rozkladu se liší (Ponnamperuma 1984). Vznikají převážně velmi toxické sloučeniny, které jsou ve vysokých koncentracích pro rostliny nebezpečné. Např.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{CH}_4$ . Za nejvíce poškozující je považován sirovodík, který vzniká činností anaerobních bakterií rodu *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum* při velice nízkém redox potenciálu (Ponnamperuma 1984, Pezeshki 1994).

Při zaplavení dochází k vytlačení molekul  $\text{O}_2$  z půdy molekulami vody. Zbytek kyslíku je vyčerpán metabolickými procesy rostlin a mikroorganismů vyskytujících se v zaplavené půdě. Akumuluje se  $\text{CO}_2$ , který je rozpustný ve vodě se kterou tvoří kyselinu uhličitou. Uhličitánové ionty reagují s dvojmocnými kationty za vzniku nerozpustných uhličitánů.

Jak vzrůstá množství akumulovaného  $\text{CO}_2$ , vyjádřeno nárůstem parciálního tlaku  $\text{CO}_2$ , snižuje se hodnota pH půdního roztoku a vzrůstá koncentrace ve vodě rozpustných iontů železa, manganu a vápníku (Ponnamperuma 1984). Mikroorganismy využívají organický substrát k získání energie a uhlíku, který využívají k vlastní syntéze. Tento proces se nazývá dekompozice organického materiálu. Anaerobní rozklad organického substrátu je energeticky méně výhodný než rozklad za aerobních podmínek. Anaerobní rozklad je pomalejší, a proto se organický materiál v půdě hromadí. Dalším produktem rozkladu je humusový materiál, který v

půdě zůstane. K rozkladu organických látek v půdě ovšem dochází i za aerobních podmínek, kdy se však zpravidla rozkládají až na minerální látky.

V důsledku zaplavení dochází v půdě k přeměně organického dusíku na anorganický amoniak. Ten je v důsledku nedostatku kyslíku konečným produktem přeměny dusíku. Hlavními přeměnami dusíku v zaplavené půdě jsou mineralizace, nitrifikace, denitrifikace, imobilizace, biologická fixace (Ponnamperuma 1984, Nilsen a Orcutt 1996). Amoniak difunduje směrem vzhůru do hypoxického sedimentu, kde je přeměněn na nitrát v procesu nitrifikace (Ponnamperuma 1984, Nilsen a Orcutt 1996). Nitrát pak difunduje dolů do anaerobního sedimentu, kde dochází k jeho denitrifikaci na  $N_2$  nebo  $NO_2$  difundující do atmosféry (Ponnamperuma 1984, Nilsen a Orcutt 1996).

Rostliny dokáží za pomoci hlízkových bakterií nebo sinic využívat volný dusík, proto když je chemicky či biologicky imobilizován je pro rostliny dočasně nedostupný. Příkladem chemických fixací je zabudování amoniaku do strukturní mřížky jílu, absorpce na koloidní částice, nebo účast při syntéze huminových kyselin (Ponnamperuma 1984).

## **2.6. Změny v rostlinném těle vyvolané hypoxií/anoxií**

### **2.6.1. Anatomické a morfologické adaptace a ovlivnění růstu**

Rostliny se liší svou schopností přizpůsobit se hypoxickým/anoxickým podmínkám. To bezpochyby souvisí s jejich rozšířením. Rostliny si vyvinuly dvě naprosto odlišné strategie jak přežít zaplavení - toleranci anoxie a vyhnutí se anoxii. Anoxická tolerance zahrnuje metabolické adaptace, které se liší mezi druhy, rostlinami i pletivy (McKersie a Leshem 1994). Tolerance k anoxickému stresu je odlišná i u kořenů jedné rostliny. Například primordia adventivních kořenů rýže přežila 7 dní trvající anoxii, kdežto seminální kořeny si udržely životaschopnost po 96 hodin a adventivní kořeny přežily pouze 8 hodin (Jackson a Drew 1984). Jako další příklad lze uvést, že kořeny a oddenky některých druhů adaptovaných na mokřadní stanoviště jako je *Iris pseudacorus* jsou schopny přežít anaerobní podmínky

způsobené dusíkatou atmosférou po několik měsíců (Crawford 1982), kdežto obiloviny jako kukuřice přežívají pouze hodiny.

V oblastech s dlouhotrvajícími záplavami rostou kořeny pouze v malé povrchové vrstvě a nevyužívají celý rozsáhlý půdní horizont jako je tomu za podmínek dobře provzdušněné půdy. V zaplavené půdě existuje několik milimetrů silná vrstva, která není úplně zbavena kyslíku (hypoxický sediment). Na druhou stranu jsou zde kořeny více vystaveny případnému negativnímu působení sucha a mechanických vlivů např. proudící vody. Obecným trendem v zaplavené půdě se zdá být to, že se vzrůstající porozitou kořene (podílem intercelulár) narůstá i hloubka, do které pronikají rostliny svými kořeny (Justin a Armstrong 1987). V dobře odvodněné půdě, kde je kyslík získáván radiální difuzí z půdy, délka kořenů ani hloubka, do které pronikají, není závislá na porozitě kořenů (Justin a Armstrong 1987).

Tvorba adventivních kořenů je podmíněna přítomností auxinu a etylenu, ale může být také podmíněna změnami v nutriční zásobě sacharidů na bázi stonku. Při zaplavení vznikají adventivní kořeny z ponořených částí stonků, kmenů a větví. Rostou horizontálně v povrchové vrstvě a slouží k nahrazení funkce původního kořenového systému (např. u *Populus*, *Salix*, *Alnus*, *Fraxinus*, *Acer*, *Eucalyptus*). Možnost transportu kyslíku v pletivech adventivních kořenů je vyšší než u původního kořenového systému v důsledku tvorby aerenchymu. Zvětšení kořenové plochy souvisí se zvýšenou oxidací rhizosféry a zvýšením aerobní respirace. U *Carex gracilis* popsali Končalová a Pazourek (1988) existenci kořenového dimorfismu. „Půdní“ kořeny jsou méně větvené, obsahují větší množství intercelulár a slouží k uchycení rostliny v substrátu a jako zásobní orgány. „Vodní“ kořeny se vyskytují v povrchové vrstvě. Mají menší množství intercelulár a slouží především k příjmu minerálních živin. Další změny se projevují v reorientaci růstových procesů. Například kořeny zaplavených rostlin začínají růst negativně gravitropicky (rostou nahoru) pravděpodobně podél kyslíkového gradientu v povrchové vodě.

V zaplavené půdě je méně asociací kořenů s buňkami tvořícími arbuskulárně-vezikulární mykorhizu, která za normálních podmínek zvyšuje příjem dusíku. Proto je v zaplavené půdě fixace dusíku u kořenů luštěnin pomalejší (Minchin a Pate 1975). Extrémní přizpůsobení je u kořenů mangrovů. Jsou vytvořeny lenticelami pokryté dýchací kořeny zvané pneumatofory s velkým množstvím aerenchymu. Bažinné dřeviny jako *Cupressaceae* a *Taxodiaceae* tvoří „kolenové kořeny“, které vyčnívají



nad povrch zaplavené půdy. Dalším přizpůsobením rostlin vystavených často zaplavení je redukce plochy listů. Tím snižují možnost tvorby vodního deficitu.

Jako reakce na anoxii se objevuje zastavení růstu listů a stonku v důsledku chybějícího dusíku nebo jiného důležitého nutričního prvku, nebo jako následek inhibice etylenem. Druhým extrémem je hypertrofický růst báze stonku nebo hypokotylu. Tento růst je důsledkem radiálního dělení a objemového růstu buněk a je také často průvodním jevem při kolapsu buněk a tvorbě aerenchymu (McKersie a Leshem 1994). Etylen může v malých koncentracích působit protikladně. Podporuje prodlužování buněk. Tím dochází k prodlužování internodií a růstu, kterým se rostlina vyhýbá stresovým podmínkám.

### **2.6.2. Tvorba aerenchymu**

Je známo, že mnohé rostliny reagují na zaplavení tvorbou provzdušňovacího pletiva – aerenchymu. Jde o parenchymatické pletivo bohaté na velké interceluláry, nejčastěji v korové oblasti kořene. Například u kukuřice a rýže se nachází v kortikální vrstvě vně od endodermis, nad kořenovou špičkou, v místech ve kterých byl již ukončen růst. Je to jedna z nejdůležitějších anatomických adaptací na hypoxii. Aerenchym se může vytvářet nejen v kořenech, ale i v oddencích, stoncích a listech (Nilsen a Orcutt 1996). V celé rostlině pak tvoří vzájemně propojený systém. Díky vzniku velkých intercelulár v kořenech a oddencích se zde také sníží množství respirujících buněk, tudíž i požadavek na kyslík je nižší (Nilsen a Orcutt 1996).

Aerenchym slouží k transportu kyslíku z prýtu do hypoxického prostředí kořenů. Dobře provzdušněné kořeny mohou uvolňovat kyslík do okolní půdy a tím reoxidovat redukované molekuly (jde hlavně o oxidaci  $Mn^{2+}$  a  $Fe^{2+}$  na nerozpustné sloučeniny). Transport plynů zde probíhá nejen difúzí, ale i rychlým tzv. hromadným tokem, k čemuž dochází v důsledku rozdílných tlaků vyvolaných kolísáním teploty nadzemní části rostlin. Dalším mechanismem transportu je snadný únik vydýchaného  $CO_2$  do okolní vody. U vodních rostlin slouží aerenchym i k nadlehčování.

V evoluci došlo u mokřadních rostlin a hydrofyt ke genetické fixaci tvorby aerenchymu. Množství intercelulárních prostor zde může dosahovat až 60% celkového objemu orgánů. Intercelulární prostory u rostlin v dobře provzdušněné půdě

tvoří méně než 5% (Larcher 2003). U suchozemských rostlin je tvorba aerenchymu vyvolána etylénem jehož produkce je podmíněna hypoxickým stresem. Za anoxických podmínek je tvorba etylénu z 1-aminocyklopropan-1-karboxy kyseliny (ACC) inhibována, protože je katalyzována enzymem, který vyžaduje alespoň nepatrné množství kyslíku.

Aerenchym může vznikat lyzigenně, schizogenně nebo rexigenně. Lyzigenní aerenchym vzniká následkem smrti specifických buněk následované jejich autolyzí a dezintegrací. Proces lyze protoplastu buněk je ohraničený a probíhá pouze v určitých korových buňkách. Začíná ztrátou turgoru, kolapsem buněčných stěn a zahuštěním cytoplazmy. Později se rozpadá tonoplast, snižuje se hustota cytoplazmy, narůstá počet vezikulárních útvarů a dochází k dezintegraci organel. Nakonec se mění chemické složení buněčných stěn, což se projevuje poklesem jejich hustoty, ztenčením a lyzí (Čiamporová a Mistrík 1991). Schizogenní aerenchym vzniká separací buněk. Třetím způsobem je rexigenní vznik intercelulár, kdy dochází k potrhání pletiva následkem nerovnoměrného růstu různých buněk v pletivu (Votrubová 1996).

### **2.6.3. Vliv na ultrastrukturu buněk**

V kořenových buňkách hrachu a kukuřice dochází při anaerobióze ke kondenzaci chromatinu v jádře a také k časové korelaci kondenzace chromatinu a omezení transkripční aktivity (Čiamporová a Mistrík 1991). Po delším působení stresu (26 hodin) pozorovali tito autoři v kořeni kukuřice opětovnou dekondenzaci chromatinu, která už může znamenat dezintegraci struktury chromatinu hydrolýzou.

Citlivou složkou jádra je i jadérko. Při dlouhotrvající anaerobióze (72 hodin) se v buňkách kořene kukuřice porušuje i jaderná membrána a v nukleoplazmě se objevují tuková tělíska. Tato změna je již považována za nevratné poškození (Čiamporová a Mistrík 1991).

Z dosud provedených pozorování ultrastrukturních změn v buňkách se zdá, že za nedostatku kyslíku vždy dochází k prodlužování a paralelnímu uspořádání cisteren endoplazmatického retikula (ER) do lineárních nebo koncentrických útvarů (Čiamporová a Mistrík 1991). Paralelní komplexy ER obklopují nebo úplně uzavírají

část cytoplazmy, někdy i s organelami. Předpokládá se, že takovéto struktury jsou součástí lysosomálního aparátu a slouží ke kontrole dezintegrace části cytoplazmatického obsahu buňky. Tím se sníží energetické nároky a zvýší se schopnost buňky přežít nepříznivé podmínky stresu (Čiamporová a Mistrík 1991). Tato reakce ER je reverzibilní.

Struktura ER je složená ze tří kategorií cisteren, které reagují různě při nedostatku kyslíku (Čiamporová a Mistrík 1991). Kratší, periferní cisterny ER v tzv. kortikální vrstvě cytoplazmy během anaerobiózy mizí. V další vrstvě cytoplazmy se vyskytují výše uvedené paralelní útvary ER. V centrální oblasti buňky okolo jádra jsou elementy ER kratší a některé přímo souvisejí s jadernou membránou. Z této kategorie cisteren vzniká perinukleární prstenec. Při dlouhotrvajícím nedostatku kyslíku dochází k fragmentaci cisteren ER (Čiamporová a Mistrík 1991).

Počet diktyozomů Golgiho aparátu v buňce je za anaerobiózy nižší než u kontrolních rostlin. Jejich cisterny a vezikuly obsahují více elektrondenzního materiálu (Rascio *et al.* 1987).

Ribozomy vyskytující se v buňkách koleoptile rýže za aerobních podmínek jsou asociovány do polyzomů, zatímco při růstu v anaerobióze jsou převážně samostatné. Jejich počet je přesto značný (Rascio *et al.* 1987).

Peroxisomy z koleoptile rýže se jeví jako jedny z organel nejvíce citlivých k anoxii. Anaerobní podmínky výrazně snižují frekvenci výskytu peroxisomů a mění jejich ultrastrukturu. Matrix byla méně homogenní a méně elektrondenzní. Obalová membrána byla redukována, tenčí a méně zřetelná (Rascio *et al.* 1987). Anoxie také způsobuje pokles aktivity enzymů obsažených v matrix peroxisomů. Výrazný byl pokles katalázy, který koreloval s poklesem počtu organel.

Buněčné membrány jsou místem, ve kterém dochází k prvnímu setkání rostlinného těla se stresovým faktorem. Plazmatická membrána, jaderné membrány, mitochondriální membrány i membrány chloroplastů jsou složeny z lipidické dvouvrstvy, proteinů, ale také z iontů a různých druhů receptorů, které rozpoznávají signály z vnějšího prostředí. Stresem způsobené změny v lipidické struktuře a/nebo v lipoproteinových komplexech mohou být následně přeneseny do různých typů

buněčných odpovědí přes biochemické změny po vyvinutí adaptivních mechanismů, jak se vyrovnat s působením stresových faktorů (Biswal a Biswal 1999).

#### 2.6.4. Vliv na mitochondrie a dýchání

V buňkách méně odolných rostlinných druhů (*Cucurbita*, *Lycopersicon*, *Zea*, *Triticum*) je už při slabší hypoxii pozorována celá řada strukturních změn mitochondrií (Čiamporová a Mistrík 1991). Uvedené změny ve struktuře mitochondrií jsou reverzibilní. V meristematických buňkách se zvětšují, nabývají nepravidelný tvar a snižuje se hustota matrix. Přeměny mitochondriálních krist na drobné vezikuly, které vyplňují celou plochu řezu organely, se zdají být specifické pro stres z nedostatku kyslíku (Grineva 1975). Tvorba fibrilárních inkluzí při anoxii byla pozorována v matrix mitochondrií kořenových buněk triticales (Čiamporová a Mistrík 1991). Autoři předpokládají, že jsou výsledkem akumulace meziproduktů při poruše metabolismu v podmínkách anoxie.

Zajímavé strukturní odpovědi mitochondrií byly pozorovány v meristémových buňkách rýže (Vartapetian *et al.* 1976), kukuřice (Čiamporová a Mistrík 1991) a v buňkách koleoptile pšenice (Vartapetian *et al.* 1976). Delší působení stresu vyvolává buď spontánní (v koleoptile rýže, v kořenu kukuřice), nebo po přidání glukózy indukovanou (v kořenu rýže) přechodnou obnovu struktury mitochondrií. Pouze když stres působí i nadále, dochází k definitivnímu poškození struktury organel. Průběh strukturní reakce může souviset s průběhem syntézy stresových proteinů a s adaptací buněk během anaerobiózy.

K indukci syntézy stresových proteinů dochází v kořenových buňkách kukuřice už v průběhu první hodiny působení stresu. Syntetizuje se řada proteinů, které označují Sachs *et al.* (1980) za „přechodné“ na rozdíl od tzv. „anaerobiózových“ proteinů, které se začínají syntetizovat až po 90 minutách. Někdy se syntetizuje až 20 druhů stresových proteinů, které představují až 70% z celkového obsahu bílkovin syntetizovaných během prvních 5-ti hodin anaerobiózy. V této době je již syntéza přechodných proteinů minimální a syntéza anaerobiózových se zastavuje po 72 hodinách v souvislosti s odumíráním buněk. Některé ze stresových proteinů mají vlastnosti glykolytických enzymů (Čiamporová a Mistrík 1991). Je možné, že díky těmto enzymům dochází k přechodnému zvýšení využití endogenních ( v případě

koleoptile pšenice a kořenu kukuřice) nebo exogenně dodaných substrátů ( v případě kořenu rýže), jak uvádějí Čiamporová a Místrík (1991). Tím je zabezpečena dodávka energie a ve stresovaných buňkách může dojít k obnově struktury mitochondrií. Podstata adaptace spočívá v tom, že v mitochondriích se nejprve zmnožují vnitřní membrány a zvětšují se celé organely. Tím se znásobuje jejich kontakt s produkty glykolýzy v cytosolu. Jestliže mají buňky s takto pozměněnými mitochondriemi k dispozici dostatek substrátu, nebo se jim dodá glukóza exogenně, oddálí se proces dezintegrace membrán. Letální stres, který vzniká při delším nedostatku O<sub>2</sub>, způsobuje enormní zvětšování mitochondrií, dilataci a dezintegraci krist, prosvětlení matrix až dezintegraci celé organely.

U rýže za anaerobních podmínek pozorovali Rascio *et al.* (1987) pokles množství mitochondrií až o 34%. Mitochondrie mají více elektrondenní matrix a více zvětšených krist. Mitochondrie nevykazovaly znaky dezintegrace. Snížení jejich počtu bylo pravděpodobně způsobeno pomalejším dělením za anoxických podmínek (Rascio *et al.* 1987).

Mitochondrie využívají kyslík jako terminální akceptor elektronů ve svém elektrontransportním řetězci. Nedostatek kyslíku blokuje aerobní respiraci (je blokován přenos elektronů cytochromoxidázou na kyslík) a tím i syntézu ATP v mitochondriích (Pradet a Bomsel 1978). Při nedostatku akceptorů elektronů je blokována oxidace NADH. Klesá poměr NAD k NADH. Mnoho enzymů v Krebsově cyklu je alostericky regulováno poměrem NADH/NAD. Když je zastavena mitochondriální respirace, zásoba energie v buňce klesne a sníží se poměr ATP ku ADP a AMP. Za nepřítomnosti adaptivních odpovědí klesne v buňkách zásoba ATP. Jedním z doplňkových zdrojů ATP pro buňku je stimulace glykolýzy, známá jako Pasteurův efekt, přestože je glykolýza relativně nevýhodná v produkci energie ve srovnání s mitochondriální respirací. Glykolýza produkuje velké množství pyruvátu, který musí být přeměněn na alternativní produkty k znovuoobnovení NAD z NADH. Konečnými produkty glykolýzy jsou především etanol, kyselina mléčná a oxid uhličitý. Pyruvát je na kyselinu mléčnou (laktát) přeměněn pomocí enzymu laktát dehydrogenázy (LDH). Následkem akumulace kyseliny mléčné klesá pH v buňce. Tento proces je známý jako cytoplazmatická acidóza. Nízké pH inaktivuje LDH jejíž optimum je okolo pH 7.0 a aktivuje pyruvát dekarboxylázu (PDC) a alkohol dehydrogenázu (ADH), které jsou při pH 7 normálně neaktivní. Buňky přepínají mezi

zpracováním pyruvátu na etanol a zpracováním pyruvátu na kyselinu mléčnou. Je to způsob jak udržet cytoplazmatické pH okolo 6.8. Alanin a jiné aminokyseliny se tvoří za předpokladu, že je přítomný  $\text{NH}_3$  – důležitý pro transaminační reakce (McKersie a Leshem 1994).

### 2.6.5. Vliv na plastidy a fotosyntézu

Vliv hypoxie/anoxie na chloroplasty a fotosyntézu byl studován mnohem méně než jejich vliv na mitochondrie a dýchání. Nedostatek kyslíku může být navozen zaplavením nebo jiným způsobem, např. umístěním rostliny do dusíku. Je důležité rozlišovat, zda do prostředí s nedostatkem kyslíku byla umístěna celá rostlina, nebo pouze kořenový systém. Umístění pouze kořenového systému do hypoxických/anoxických podmínek se budu podrobněji věnovat v kapitole 2.7. Tímto způsobem byly prováděny pokusy, jejichž výsledky jsou uvedeny v této práci. V citované literatuře popisující vliv zaplavení na fotosyntézu, otevřenost průduchů a translokaci asimilátů není mnohdy přesně uvedena míra zaplavení a není známo zda míra zaplavení byla stálá.

Alscher – Herman *et al.* (1979) v jedné z prvních prací tohoto typu zjistili, že v chloroplastech hrachu dochází vlivem anoxie k disociaci ribozomů a membrán tylakoidů, což je zřejmě důsledek snížené produkce energie. Dále dochází ke snížení obsahu RNA v chloroplastech a schopnosti inkorporovat aminokyseliny. Izolované tylakoidy chloroplastů hrachu měly ribozomy asociované s membránami. Když byly tylakoidy umístěny do tmy a bezkyslíkatého prostředí po dobu dvou hodin, došlo k porušení těchto vazeb. Po následném umístění tylakoidů do kyslíkem bohatého prostředí a na světlo došlo po osmi hodinách k obnovení vazeb mezi tylakoidními membránami a ribozomy. Knacker *et al.* (1984) kvantitativně sledovali působení celkové hypoxie ( 4 % kyslíku v atmosféře místo 21 %) na chloroplasty semenáčků *Amaranthus*. Po třech týdnech pěstování v hypoxických podmínkách pozorovali snížení poměru přitisklých a nepřitisklých tylakoidů v chloroplastech buněk pochev cévních svazků (v porovnání s kontrolními rostlinami). V chloroplastech mezofylových buněk nebyly žádné průkazné změny v ultrastruktuře pozorovány. Rascio *et al.* (1987) zjistili při pěstování rýže za anaerobních podmínek (v atmosféře dusíku), že plastidy v buňkách koleoptilí stresovaných rostlin se příliš neliší od

plastidů u kontroly. Nalezli v nich však větší objemové hustoty škrobových inkluzí. Daleko více byly anoxií ovlivněny mitochondrie a zvláště peroxizomy. Čiamporová a Mistrík (1991) shrnují, že plastidy pod vlivem stresu zaplavení svou vnitřní strukturu nemění. Wroblewska *et al.* (1994) sledovali deetiolizaci rostlin fazolu za nízké (2%), běžné (21%) a vysoké (100%) koncentrace kyslíku. Ultrastruktura plastidů byla hodnocena kvantitativně. Zjistili, že nízká koncentrace kyslíku stimuluje vývoj fotosyntetického aparátu - rozpad prolamelárních těles, syntézu chlorofylu, tvorbu gran, ukládání škrobu – kdežto vysoká koncentrace kyslíku jej inhibuje. V poslední době se vlivu hypoxie na chloroplasty opakovaně věnoval Ladygin. Jeho práce sledují kořenovou hypoxii a jsou tedy uvedeny v kapitole 2.7.

Hypoxie výrazně ovlivňuje rychlost fotosyntézy. Dále byl pozorován i pokles obsahu chlorofylu a karotenoidů a zavírání průduchů, jak uvádějí Čiamporová a Mistrík (1991). Ti považují za příčinu snížení fotosyntetické aktivity změny vodního režimu rostlin rostoucích v podmínkách hypoxie. Snižuje se hydraulická vodivost kořene a tudíž dochází k dehydrataci buněk. S klesajícím turgorem v buňkách dochází i k zavírání průduchů. V důsledku inhibice transportu asimilátů může docházet také k inhibici fotosyntézy podmíněné nahromaděním asimilátů v listech.

U fazolu klesá po 7 denním zaplavení aktivita fotosyntézy téměř k nule. Jednodenní zaplavení redukuje fotosyntézu na 17% proti kontrole a způsobuje snížení suché hmotnosti rostliny. K zaplavení citlivé rostliny reagují na stres zaplavením drastickým snížením čisté fotosyntézy. Např. u semenáčků citrusů je čistá fotosyntéza po 10-ti dnech působení stresu redukována o více než 90%. U semenáčků *Quercus falcata var. pagodaefolia* se fotosyntéza blíží k nule po 3 dnech. Stejná reakce byla pozorována u rostlin pepře. Obdobným způsobem reaguje na zaplavení většina rostlinných druhů, míra jejich reakce se liší v závislosti na stupni adaptace daného druhu.

Pokles fotosyntetické aktivity může být způsoben také dalšími metabolickými procesy. Přesné mechanismy inhibice však nejsou doposud známy. Pokles fotosyntetické aktivity může být způsoben i poklesem kapacity mezofylu. Metabolické změny zahrnují i pokles aktivity fotosyntetických enzymů. Aktivita těchto enzymů je velmi citlivá ke změnám vnějšího prostředí (Pezeshki 1994). Důležitá je i regulace obratu proteinů, např. chlorofylchlorofylidohydrolázy, která katalyzuje první krok v karboxylaci chlorofylu. Stres ovlivňuje aktivitu fotosyntézy

také přes působení na enzym Rubisco. Rubisco tvoří až 70% všech rozpustných listových proteinů. Stresové faktory mění degradaci Rubisca např. u *Solanum* a redukuje jeho aktivitu např. u *Glycine max*. Rubisco katalyzuje karboxylaci poskytující dvě molekuly 3-fosfoglycerátu a oxygenaci produkující jednu molekulu 3-fosfoglycerátu a jednu molekulu 2-fosfoglykolátu. Zaplavení může způsobovat změny v aktivitě Rubisca (Pezeshki 1994).

Další faktory omezující aktivitu fotosyntézy jsou předčasná senescence listů a deficit cytokininů. Např. u rajčete se v listu akumuluje ABA, zatímco cytokinin je vyčerpán, což vede ke snížení listové regenerační kapacity ribulóza bisfosfátu. Množství cytokininů je závislé jak na jejich transportu z kořenů tak na jejich produkci v listech. Při deficienci kyslíku dochází v kořenech fazolu k redukcí transportu cytokininů xylemem, ale množství cytokininů v listových pletivech se nezmění. Předpokládá se tedy, že důležitější než množství cytokininů je jejich kompartmentizace a/nebo aktivita jejich poolů.

Průduchy se podílejí na regulaci výměny plynů mezi vnitřním prostředím listu a okolím. Za standardních podmínek dochází při příjmu jedné molekuly CO<sub>2</sub> k transpiraci 100 až 500 molekul vody. Průduchy citlivě reagují na aktuální prostředí ve kterém se rostlina nachází, tím optimalizují denní příjem molekul CO<sub>2</sub>. Při stresu zaplavením paradoxně dochází k uzavírání průduchů v důsledku snižování vodního potenciálu v listech. Uzavření průduchů v listech zaplavených rostlin je způsobeno zejména akumulací kyseliny abscisové (ABA). K akumulaci ABA v listech dochází vzrůstem její syntézy v kořenech a následnou translokací do prýtu. Alternativní syntéza ABA se může objevit ve stonku jako následek redukce translokace asimilátů a růstových faktorů kořeny.

Při dlouhotrvajících záplavách se může objevit znovuotevření průduchů jako nutný následek potřeby rostliny přijímat uhlík. Stupeň opětovného nabytí normální funkce průduchů závisí na době, po kterou byla rostlina stresu vystavena. Po krátkodobém trvání stresu zaplavením je znovuobnovení funkce průduchů rychlejší než u průduchů, které byly stresu vystaveny dlouhodoběji. Při dvoutýdenním zaplavení zůstávají průduchy u *Betula papyrifera* uzavřeny, zatímco u *Quercus macrocarpa* a *Platanus occidentalis* trvá uzavření průduchů až 30 dnů (Pezeshki 1994). U druhů tolerantních k zaplavení jako jsou *Taxodium distichum* a *Fraxinus pennsylvanica* bylo pozorováno otevření průduchů a růst fotosyntetické aktivity.



Při dlouhotrvajícím zaplavení byla pozorována korelace mezi tvorbou adventivních kořenů a znovuotevřením průduchů (Pezeshki 1994). Průduchy jedné rostliny reagují za působení stejných stresorů rozdílně. Tento jev se nazývá mozaikovitá struktura v otevřenosti průduchů. Jednotlivé průduchy reagují na stres individuálně a ne jako jednotný komplex. Mozaikovitá struktura v otevřenosti průduchů se vyskytuje převážně u rostlin s heterobarickými listy.

Stres zaplavením ovlivňuje translokaci fotosyntetických produktů. Např. u sojových bobů se změnil podíl transportu asimilátů do kořenů. Během 30-40 minut se u *Cucurbita melopepo* redukoval pohyb asimilátů o 35-45%. Podobné narušení translokace asimilátů bylo pozorováno i u jiných druhů. Způsob translokace sacharidů se ukázal být kritický pro toleranci rostlin k hypoxii (Pezeshki 1994).

## 2.7. Posthypoxický/postanoxický stres

Po ukončení působení stresových podmínek se musí rostliny vyrovnat s přechodem do podmínek optimálních. Musí zpětně adaptovat svůj metabolismus na aerobní. Komplex těchto reakcí vyvolává další stres (VanToai a Bolles 1991; Albrecht a Wiedenroth 1994; Crawford a Braendle 1996; Beamelt *et al.* 1998). K největšímu počtu těchto reakcí dochází v kořenovém systému. Značným problémem je vyrovnání se s ROS. Aktivita látek, uplatňujících se během působení hypoxického stresu, sloužících k obraně proti ROS klesá a tudíž je nutné, po návratu rostlin do podmínek aerobních, nasyntetizovat tyto látky znovu. To zabere nějaký čas, po který jsou rostliny nejvíce náchylné na působení posthypoxických stresových podmínek. Za působení hypoxického stresu dochází v rostlinách ke zvýšené produkci etanolu. Ten se hromadí nejen v kořenech, ale také v jejich okolí (Crawford a Braendle 1996 a Beamelt *et al.* 1998). Při navrácení rostliny do optimálních podmínek dochází k metabolizaci etanolu na toxický acetaldehyd. Ten působí na rostliny velmi nepříznivě.

Tématu působení posthypoxického/postanoxického stresu na rostliny se bohužel věnuje pouze nepatrné množství prací.

## 2.8. Vliv hypoxie/anoxie kořenového systému na ultrastrukturu, složení a funkce chloroplastů

Prací, zabývajících se touto problematikou, lze najít v literatuře od počátku studia ultrastruktury rostlinných buněk pomocí elektronové mikroskopie až do současnosti jen několik. Zřejmě první prací o vlivu zaplavení kořenového systému na ultrastrukturu chloroplastů, jak uvádějí sami její autoři, je práce Wample a Davis (1983) na slunečnici. Zjistili, že po čtyřdenním zaplavení se v chloroplastech hromadí více škrobu ve srovnání s kontrolou. Může to být důsledek sníženého odvodu asimilátů floémem po poklesu metabolismu kořenů. Naopak Hurng a Kao (1993) zjistili po čtyřdenním zaplavení kořenů rostlin tabáku v chloroplastech vymizení škrobových inkluzí, zvýšení aktivity amylázy, dilataci tylakoidů a silný pokles obsahu chlorofylu a bílkovin. Domnívají se, že úbytek škrobu je důsledkem odvodu rozpustných sacharidů do mladších listů. Po dvoudenním zaplavení byly rozdíly proti kontrole malé. Daugherty *et al.* (1994) sledovali genotypy *Brassica rapa* s různou tolerancí k zaplavení a našli po čtyř – a vícedenním zaplavení kořenů v listových chloroplastech zvláště velké škrobové inkluze, které u citlivých rostlin mohou narušovat grana. Hromadění a odbourávání škrobu je zřejmě velmi citlivé na působení hypoxického stresu a záleží i na pokusné rostlině.

Ladygin (1999) a Ladygin a Semenova (1999) sledovali vliv prohlubující se hypoxie až anoxie kořenů rostlin hrachu v živném roztoku probublávaném argonem na řadu strukturních a zejména funkčních charakteristik chloroplastů. Zjistili jen malé rozdíly proti kontrole – zejména úbytek chlorofylu a snížení rychlosti fotosyntézy. Při delší anoxii bylo v chloroplastech více plastoglobulů, což je obecný znak doprovázející odbourávání membrán tylakoidů při stresu a/nebo stárnutí. Ladygin (2004) studoval vliv prohlubující se hypoxie až anoxie kořenů rostlin hrachu, v živném roztoku, na chloroplasty v postupně se vyvíjejících párech listů, v kombinaci s působením deficiencie železa. Domnívá se, že oba stresory působí různými mechanismy, i když v obou případech je konečným důsledkem chloróza listů. Ultrastruktura chloroplastů nebyla ani zde hodnocena kvantitativně.

Bragina *et al.* (2004) se zabývaly vlivem zaplavení kořenového systému semenáčků kukuřice na jejich fotosyntézu a temnotní dýchání. Ve třetím listu semenáčků, vyrostlém během zaplavení, zjistili například snížení respirační aktivity

ale zároveň i zvýšenou rychlost fotosyntézy. Podle autorek čelí rostliny negativnímu vlivu kořenové hypoxie na systémové úrovni.

V žádné z prací, citovaných v této kapitole, nebyl hodnocen vliv posthypoxického stresu na pokusné rostliny.

## 2.9. Cíle diplomové práce

Na základě prostudování uvedené literatury jsem si stanovila následující cíle:

- 1) Kvantitativně zhodnotit rozměry a ultrastrukturu mezofylových chloroplastů u rostlin kukuřice pod vlivem zaplavení kořenového systému a s ním spojené hypoxie.
- 2) Stanovit aktivitu Hillovy reakce a aktivitu PSI izolovaných mezofylových chloroplastů rostlin kukuřice pod vlivem hypoxického stresu.
- 3) Stanovit změny obsahu fotosyntetických pigmentů u rostlin kukuřice pod vlivem hypoxického stresu.
- 4) Porovnat citlivost dvou genotypů kukuřice (CE704 a 2023) lišících se fotosyntetickou aktivitou a růstovými vlastnostmi na působení hypoxického stresu.
- 5) Všechny charakteristiky, uvedené v bodech 1-3, zhodnotit také pro působení posthypoxického stresu (po návratu rostlin do optimálních růstových podmínek).

## **3. MATERIÁL A METODY**

### **3.1. Rostlinný materiál a jeho kultivace**

Pokusným materiálem byly rostliny kukuřice seté (*Zea mays L.*) dvou genotypů – 2023 a CE704, dále bude označován pouze 704. Osivo pocházelo ze šlechtitelské stanice CEZEA v Čejči u Hodonína (Česká republika).

Pokusy byly naplánovány a rozděleny do dvou sérií (pokusná série I, pokusná série II – obilky vysety o dva týdny později) tak, aby si, pokud jde o způsob a podmínky pěstování (délka dne, teplota, fotoperioda), co nejvíce odpovídaly. Pokusy byly prováděny na jaře.

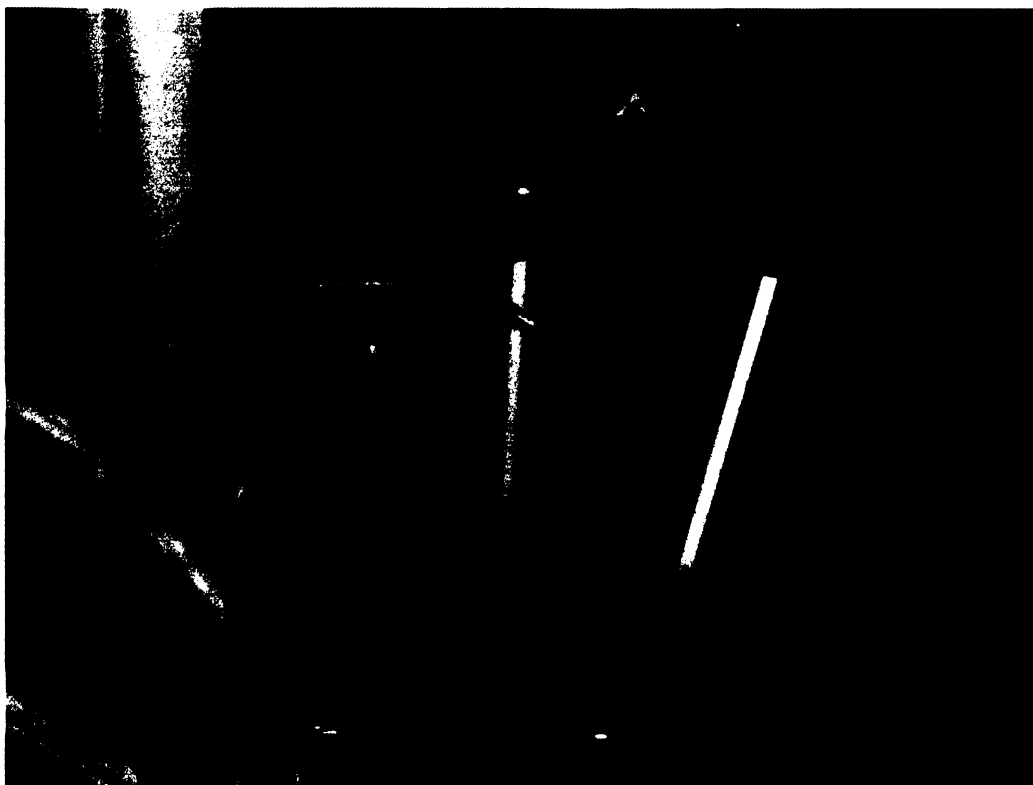
Obilky byly nejprve vysety do sadbovačů a 27. den od výsevu byly rostliny přesazeny do květináčů (průměr x výška = 11x11 cm). 33. den od výsevu byly rostliny rozděleny do dvou skupin. Rostliny první skupiny (kontrolní) byly ponechány na dosavadním místě. Rostliny druhé skupiny (pokusné) byly přemístěny do nádrží s vodou (voda dosahovala 2 cm pod okraj květináčů) a 9 dnů stresovány. Po ukončení stresu byl proveden první pokus (pokus A, „stres“) současně u kontrolních i stresovaných rostlin. Poté byl stres zaplavením ukončen a všechny rostliny byly dále pěstovány za standardních podmínek. 62. den od výsevu (tj. 20. den od ukončení působení stresu) byl proveden druhý pokus (pokus B, „obnova“).

Pokusný materiál byl odebírán 1,3 – 1,8 hodin po začátku světelné periody. Rostliny byly přes den pěstovány při teplotě 25 – 35 °C a přes noc při teplotě 15 – 20 °C, s délkou dne 11,3 – 15,8 hodin. Relativní vlhkost vzduchu byla 70 – 95 %. Kontrolní rostliny byly zalévány tak, aby byly zaručeny optimální růstové podmínky. U zaplavených rostlin byla udržována stálá míra zaplavení.

Obr. 1. Způsob pěstování kontrolních rostlin.



Obr. 2. Detail báze stonků u kontrolních rostlin.



Obr. 3. Způsob pěstování pokusných rostlin – hypoxický stres.



Obr. 4. Detail báze stonků u pokusných rostlin – hypoxický stres.



## 3.2. Morfologické a fyziologické charakteristiky rostlin

### 3.2.1. Měření morfologických parametrů a vzhled rostlin

Po celou dobu pěstování pokusných rostlin byly sledovány různé morfologické parametry a jejich změny (vzhled rostlin, žloutnutí listů, změna barvy stonku, tvorba adventivních kořenů). Dále byla měřena délka internodií a délka a počet plně vyvinutých listů u osmi náhodně vybraných rostlin od každého genotypu.

### 3.2.2. Stanovení RWC (relativního obsahu vody) v listech

Ve všech pokusných sériích byl u sledovaných genotypů stanoven rovněž relativní obsah vody. Čtyři plně vyvinuté listy byly ihned po odebrání zváženy (čerstvá hmotnost) a ponechány 5 hodin ve zkumavkách s vodou. Poté byly opět zváženy (nasycená hmotnost) a sušeny 24 h při teplotě 80 °C. Po vysušení byly listy opět zváženy (suchá hmotnost).

$$RWC = [(čerstvá\ hmotnost - suchá\ hmotnost) / (nasycená\ hmotnost - suchá\ hmotnost)] \times 100 [\%]$$

Pro výpočet RWC byl vždy použit aritmetický průměr všech čtyř hodnot. RWC je uváděna v %.

### 3.2.3. Specifická hmotnost listu a obsah pigmentů

Ze střední třetiny listové čepele zbavené centrální žilky bylo vždy vysekáno 10 terčků (o průměru 8 mm) pro určení specifické hmotnosti listu a pro stanovení obsahu chlorofylu v listových pletivech (zbytek listu byl použit pro stanovení fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů).

Čtyři terčky byly vysušeny při teplotě 80 °C a byla stanovena jejich hmotnost na torzních analytických mikrováhách Sartorius (Německo). Specifická hmotnost listu byla vyjádřena jako hmotnost sušiny na jednotku plochy listové čepele a byla vyjádřena v g.m<sup>-2</sup>. Měření byla prováděna ve třech opakováních.

Zbýlých šest terčků bylo extrahováno v 10 cm<sup>3</sup> N,N-dimetylformamidu a vzorek uchovávan sedm dní v lednici. Vzorky byly pravidelně promíchávány, aby nedošlo ke vzniku pigmentového gradientu. Po sedmi dnech byla změřena absorbance



jednotlivých vzorků při 480 nm (maximum absorbance karotenoidů), 663 nm (maximum absorbance chlorofylu *a*) a 645 nm (maximum absorbance chlorofylu *b*). Obsah fotosyntetických pigmentů, uváděný ve výsledcích, byl vyjádřen v přepočtu na jednotku listové plochy (vyjádřeno v  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a na jednotku suché hmotnosti (vyjádřeno v  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Ze získaných hodnot byl vypočítán obsah celkového chlorofylu (Chl *a+b*), poměr chlorofylů *a* a *b* (Chl *a/b*) a poměr celkového chlorofylu a karotenoidů (Chl/Kar). Měření byla opět prováděna ve třech opakováních.

### 3.3. Měření fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů

Fotochemická aktivita izolovaných mezofylových chloroplastů byla měřena jako aktivita Hillovy reakce (AHR) a aktivita fotosystému I (PSI). Výsledky byly vyjádřeny v přepočtu na jednotku listové plochy (LP) (vyjádřeno v  $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), v přepočtu na jednotku suché hmotnosti listové čepele (S) (vyjádřeno v  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) a v přepočtu na jednotku obsahu chlorofylu (chl) (vyjádřeno v  $\text{mmol O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ chl}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

Vzorky listového pletiva byly odebírány 1,3 – 1,8 hodin po začátku světelné periody z plně vyvinutého již nerostoucího 4. listu (u pokusné série I A a II A) a 5. listu (u pokusné série I B a II B). Pro každý pokus bylo odebráno 10 listů (listy z 10 rostlin) od každého genotypu. Ze střední třetiny listové čepele zbavené centrální žilky byly vysekány terčíky (o průměru 8 mm) pro určení specifické hmotnosti listu a pro stanovení obsahu chlorofylu v listových pletivech. Přibližně dva až tři gramy listového pletiva (nastříhaného na menší části) byly homogenizovány ve 40  $\text{cm}^3$  izolačního roztoku (0,4  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  sacharóza, 0,05  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,05  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7,0) v homogenizátoru Thurmix 302 (MPW, Polsko) při maximu otáček po dobu 18 s. Homogenát byl přefiltrován přes osm vrstev gázy a suspenze následně centrifugována v chladné centrifuze K23 (VEB MLW Medizintechnik, Leipzig, Německo) při 1000x g po dobu 10 min. Pelet byl resuspendován v malém objemu resuspendačního média 1-1,3  $\text{cm}^3$  (0,4  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  sacharóza, 0,006  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 40 % glycerol, 0,05  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7,0). Vzniklá suspenze byla uchovávána do zahájení měření fotochemické aktivity chloroplastů ve tmě a při teplotě 0 až 4 °C.

K měření AHR byla využita polarografická metoda založená na stanovení množství kyslíku uvolněného suspenzí izolovaných chloroplastů (kyslíková elektroda Clarkova typu, Theta 90', ČR) v uzavřené expoziční komůrce (sestrojené podle Bartoš

*et al.* 1975). Reakční roztok v měrné komůrce byl shodný s izolačním roztokem. Chloroplastová suspenze s reakčním roztokem byla probublávána dusíkem, aby došlo k vytěsnění většiny kyslíku. Poté byl přidán ferikyanid draselný  $K_3[Fe(CN)_6]$  jako umělý akceptor elektronů, jeho konečná koncentrace v komůrce byla  $7 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Komůrka byla uzavřena a vzorek ponechán jednu minutu ve tmě. Poté byl vzorek v komůrce na tři minuty osvětlen "bílým světlem" ( $170 \text{ W.m}^{-2}$ ). Měření bylo prováděno při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vždy byla provedena dvě až tři opakování.

Aktivita PSI byla měřena obdobně, za stejných podmínek, na základě spotřeby kyslíku v exponovaném vzorku. Reakční roztok obsahoval  $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$  sacharózu a  $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfátový pufr, pH 6,5. Jako donor elektronů pro PSI sloužil  $0,15 \text{ mmol.l}^{-1}$  DCPIP, redukovaný  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$  askorbátem sodným. Jako akceptor elektronů byl použit  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  metylviologen. Při reakci dochází k nedokonalé oxidaci a vznikají superoxidové radikály  $O_2^*$ , které reagují s vodou za vzniku peroxidu vodíku. Přidaná kataláza imobilizuje vznikající  $H_2O_2$  za vzniku  $H_2O$  a  $O_2$ . Jako inhibitor elektronového transportu z PSII na PSI byla použita  $0,01 \text{ mmol.l}^{-1}$  DCMU. Dále byl přidán  $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$   $NH_4Cl$  bránící následné fosforylaci. Rovněž byla prováděna dvě až tři opakování.

### **3.4. Stanovení obsahu chlorofylu v suspenzích izolovaných chloroplastů**

V každé suspenzi chloroplastů byl stanoven obsah chlorofylu za použití metody spektrofotometrického stanovení absorbance chlorofylu *a* a *b* v 80% acetonu.  $50\mu\text{l}$  chloroplastové suspenze bylo extrahováno v  $5 \text{ ml}$  80% roztoku acetonu. Roztok byl centrifugován při  $1000x$  g po dobu  $10 \text{ min}$  pro odstranění zbytků buněk. Supernatant byl použit pro stanovení absorbance při  $663 \text{ nm}$  (maximum absorbance chlorofylu *a*),  $645 \text{ nm}$  (maximum absorbance chlorofylu *b*) a  $710 \text{ nm}$  (vyjadřuje čírost acetonového extraktu). Hodnoty absorbance byly použity pro výpočet koncentrace chlorofylu (*a+b*) dle Porra *et al.* (1989). Měření bylo provedeno ve dvou opakováních pro každý vzorek.

Fotochemická aktivita chloroplastů byla vyjadřována na jednotku obsahu chlorofylu, získaného z těchto měření.

### 3.5. Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii

Pro elektronovou mikroskopii byly odebírány vzorky listů kukuřice z pokusné i kontrolní varianty ze střední třetiny čepele, mezi okrajem listu a středním žebrem, plně vyvinutého, již nerostoucího čtvrtého listu (dospělost listu byla zjišťována měřením délky listové čepele). Vzorky o velikosti přibližně 5 mm<sup>2</sup> byly odebírány ze čtyř rostlin každé varianty 42. den od výsevu, tj. 9. den od počátku působení stresu a 62. den od výsevu, tj. 20. den od ukončení stresu.

Vzorky pro sledování ultrastruktury a stereologické hodnocení chloroplastů byly fixovány dvě hodiny v glutaraldehydové fixáži [5% (v/v) roztok glutaraldehydu v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> fosfátovém pufru, pH 7,3]. Fixace probíhala ve tmě za laboratorní teploty a tlaku. Vzorky byly třikrát po 15 minutách vyprány ve fosfátovém pufru. Poté byly dvě hodiny fixovány kyselinou osmičelou [2% (m/v) roztok oxidu osmičelého v témž pufru]. Fixace probíhala za týchž podmínek jako předešlá fixace glutaraldehydem. Po vyprání pufrům (dvě výměny po 15 minutách) byly vzorky odvodněny v odvodňovací řadě z čistého (nedenaturovaného) etanolu (výměna roztoku po 30 minutách). V 70% etanolu s 1% octanem uranylu byly celé objekty kontrastovány (tj. ponechány v daném roztoku přes noc). Poté byly dvakrát vyprány 70% etanolem a byla dokončena odvodňovací řada až po 100% etanol. Přes propylenoxid jako intermedium byly vzorky převedeny do Spurrůva nízkoviskozitního média (epoxidová pryskyřice, Spurr 1969). V něm byly vzorky ponechány dvě hodiny za laboratorní teploty. Poté byly ponechány přes noc v chladničce. Druhý den byly vzorky zality čerstvě připraveným Spurrovým médiem do plochých pryžových forem. Formy byly ponechány přes noc při teplotě 65°C aby došlo ke zpolymerizování média.

Z takto získaných bločků byly připravovány řezy na ultramikrotomu Reichert Om U2 (Rakousko) skleněnými noži (sklo LKB, Švédsko) a na ultramikrotomu Leica (Německo) skleněnými noži a diamantovým nožem. Byly řezány poloténké řezy o tloušťce asi 1 μm, používané k orientaci v řezaném objektu. Byly barvené 1% roztokem toluidinové modři v 1% tetraboritanu sodném a pozorované ve světelném mikroskopu Olympus BX 40 (Japonsko). Poté byly řezány ultratenké řezy o tloušťce 50 až 100 nm. Řezy byly přenášeny na měděné síťky, kontrastovány 20 minut nasyceným roztokem octanu uranylu v 70% etanolu a dvakrát opláchnuty destilovanou vodou. Poté byly kontrastovány 20 minut alkalickým roztokem citronanu

olovnatého podle Reynoldse (Reynolds 1963) a znovu dvakrát opláchnuty. Takto zpracované řezy byly připraveny pro pozorování v elektronovém mikroskopu.

### 3.6. Transmisní elektronová mikroskopie

Elektronmikroskopické snímky byly získávány pomocí transmisního elektronového mikroskopu Philips EM 268 Morgagni (Nizozemí) při primárních zvětšeních 5 000-10 000x. Byly snímány pouze přibližně mediální příčné řezy chloroplastů. Ze získaných negativů byly zhotovovány pozitivy o celkovém zvětšení 25 000x až 40 000x. Na těchto fotografiích byla stereologicky hodnocena ultrastruktura chloroplastů v buňkách listového mezofylu, podobným způsobem jako v práci Kutík *et al.* (2004).

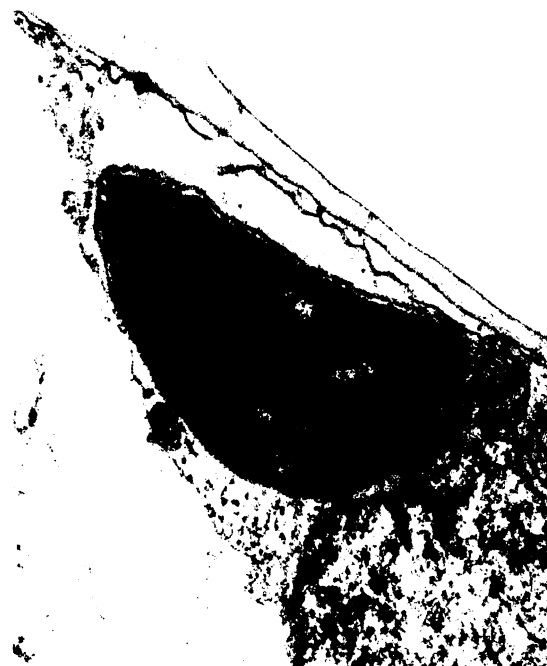
Obr. 5. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu. Chloroplasty BSC z pokusné série I, hypoxický stres, genotypu 704.

Obr. 6. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu. Chloroplast MC z pokusné série I, hypoxický stres, genotypu 704.

Obr. 5.



Obr. 6.



Obr. 7. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu. Chloroplast MC z pokusné série I, hypoxický stres, genotypu 704.

Obr. 8. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu. Chloroplast MC z pokusné série I, kontrolní rostlina, genotypu 704.

Obr. 7.



Obr. 8.



### 3.7. Stereologie

Kvantitativní hodnocení ultrastruktury chloroplastů bylo prováděno stereologickou metodou za použití testovacích mřížek (rastrů). Při stereologických měřeních je nutno zachovávat náhodnost rozložení testovacích systémů (bodů, čar, rovin) a zvolit vhodné rozmístění (vzdálenost) testovacích elementů (Gundersen a Jensen 1987). Testovací mřížky umožňují odhad parametrů charakterizujících trojrozměrné struktury na základě měření dvourozměrných plošných struktur (řezů). Bodové mřížky lze také použít k odhadu plochy řezů struktur (Gundersen a Jensen 1987).

Touto metodou byly zjišťovány objemové hustoty (relativní parciální objemy) strukturních částí chloroplastů. Objemová hustota  $V_v$  je definována jako poměr objemu sledované struktury  $V_s$  ( $\mu\text{m}^3$ ) k objemu objektu ji obsahující  $V_o$  ( $\mu\text{m}^3$ ):  $V_v =$

$V_s / V_o$ . Objemová hustota může být odhadnuta počítáním bodů, protože je úměrná plošné hustotě, a ta zase bodové hustotě, tj. podílu bodů testovací mřížky, které zasáhnou sledovanou strukturu z celkového počtu bodů, které zasáhnou celý objekt (Kubínová 1993). Je však nutné hodnotit pouze reprezentativní řezy chloroplastů (tj. řezy přibližně mediánní), aby nedocházelo ke zkreslení získaných dat.

Na fotografiích mezofylových chloroplastů kukuřice byla vždy nejprve zvýrazněna hranice řezu chloroplastem, kterou tvoří vnější obalová membrána (obtaženo černým slabým fixem). Poté byly přikládány bodové rastry dvojí hustoty – „hrubý“ a „jemný“. Body „hrubého“ rastru byly od sebe vzdáleny 18 mm a body „jemného“ rastru 6 mm. Body rastru musí mít jinou periodu než je perioda sledované struktury. Pomocí hrubého rastru byla zjištěna celková plocha řezu a plocha intergranálních a granálních tylakoidů. Jemným rastrem byla zjištěna plocha periferního retikula, plocha plastoglobulů a plocha škrobových inkluzí. Zbývající plocha do 100% byla brána jako plošná hustota stromatu (tj. byl sem zahrnut i periplastidový prostor). Každý chloroplast byl pomocí obou bodových rastrů 3x změřen. Rastr byl přikládán pod úhly  $0^\circ$ ,  $30^\circ$  a  $60^\circ$  mezi spodním okrajem fotografie a rastru. Ze získaných počtů bodů byla vypočítána plošná hustota, která byla zároveň považována za objemovou hustotu.

Dále byla měřena délka a šířka řezu chloroplastem jako délka dlouhé a krátké osy řezu.

### **3.8. Statistické zpracování dat**

Získaná data byla zpracovávána ve statistickém programu CoStat verze 6.204 (CoHort Software, Monterrey California, U.S.A). Testovaná data měla normální rozdělení. Testované soubory získané z dat ze stereologického hodnocení měly velikost  $n = 20$ . Testované soubory získané z měření funkčních fotochemických charakteristik měly velikost  $n = 4$ .

Použitím analýzy variance trojného třídění s interakcemi bylo zjištěno, zda jsou v rámci každého pokusného bloku (A/B) statisticky průkazné rozdíly mezi genotypy (G), zda se liší hodnoty daných charakteristik pro kontrolní rostliny a pro rostliny pod vlivem hypoxického nebo posthypoxického stresu (P) a mezi pokusnou sérií I a II (S). Bylo také ověřováno zda dochází k interakcím  $G \times P$ ,  $G \times S$ ,  $P \times S$  a  $G \times P \times S$ .

Pomocí analýzy variance dvojného třídění s interakcemi bylo zjištěno, zda existují průkazné rozdíly mezi G, P a interakce G x P v rámci jednotlivých sérií. Analýzou variance jednoduchého třídění bylo zjišťováno, jestli se liší hodnoty jednotlivých charakteristik v rámci jednotlivých bloků uvnitř sérií mezi genotypy a dále zda se v rámci genotypů v každém bloku a sérii významně liší hodnoty charakteristik pro kontrolní rostliny a pro rostliny pod vlivem hypoxického nebo posthypoxického stresu. Získaná data byla zaznamenána do tabulek.

## **4. VÝSLEDKY**

V této diplomové práci byly hodnoceny funkční fotosyntetické charakteristiky chloroplastů (AHR a PSI, obsah chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů a jejich vzájemné poměry, RWC a SpHm), morfologické charakteristiky rostlin (délka listu, výška rostlin) a ultrastrukturní stereologické charakteristiky chloroplastů v buňkách mezofylu u dvou inbredních linií kukuřice (*Zea mays* L.) genotypu CE704 a genotypu 2023 pěstovaných v optimálních a hypoxických podmínkách (při zaplavení kořenového systému). Dále byly porovnávány jednotlivé parametry i u kontrolních rostlin a stresovaných rostlin navrácených po devítidenní periodě stresu do optimálních podmínek (posthypoxický stres). Výsledky získané měřením morfologických charakteristik a sledováním vzhledu rostlin jsou uvedeny v tabulkách (tab. 1. až 4.). Výsledky získané z měření funkčních fotosyntetických charakteristik u obou inbredních linií jsou uvedeny formou grafů (graf 6. až 17.) a statistické zpracování těchto dat je uvedeno v tabulkách (tab. 5. až 18.). Výsledky získané z měření ultrastrukturních stereologických charakteristik chloroplastů jsou uvedeny formou grafů (graf 18. až 21.) a statistické zpracování těchto dat je uvedeno v tabulkách (tab. 19. až 32.).

### **4.1. Charakteristiky růstových podmínek a morfologické charakteristiky a vzhled rostlin**

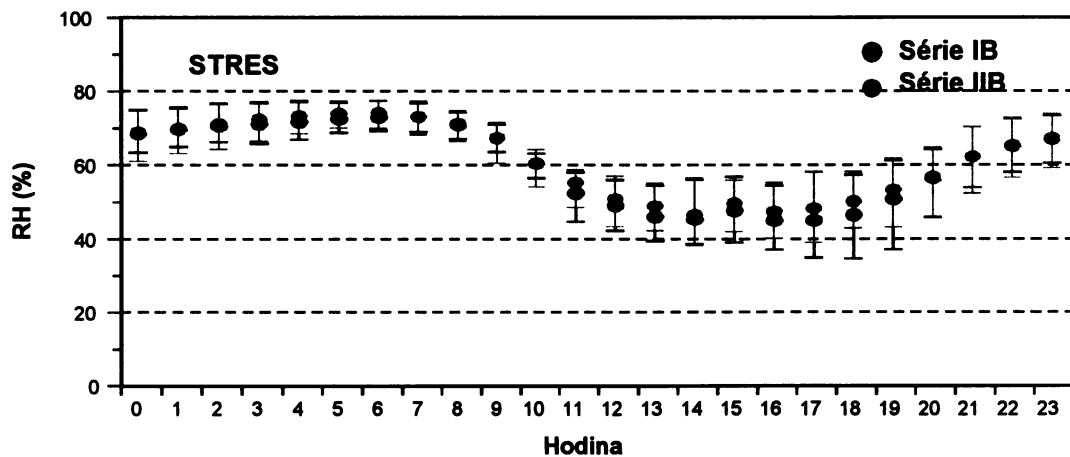
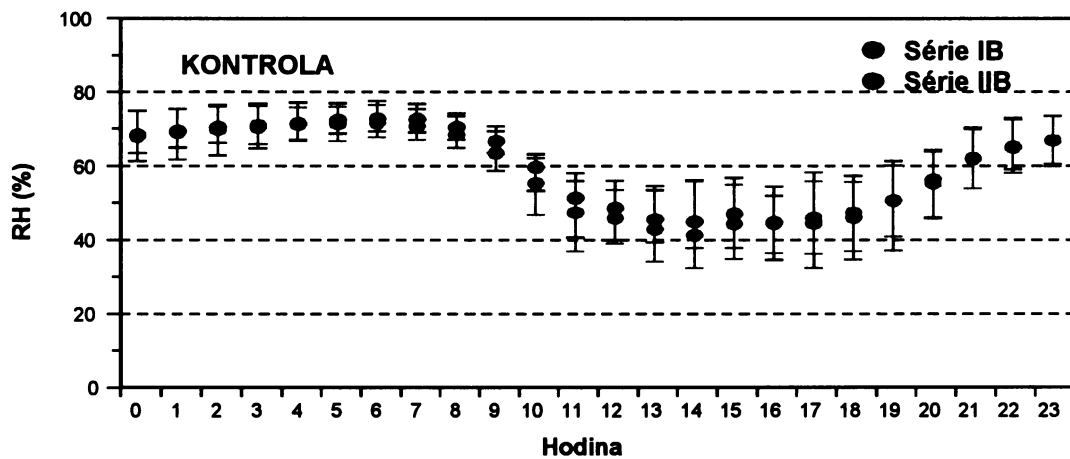
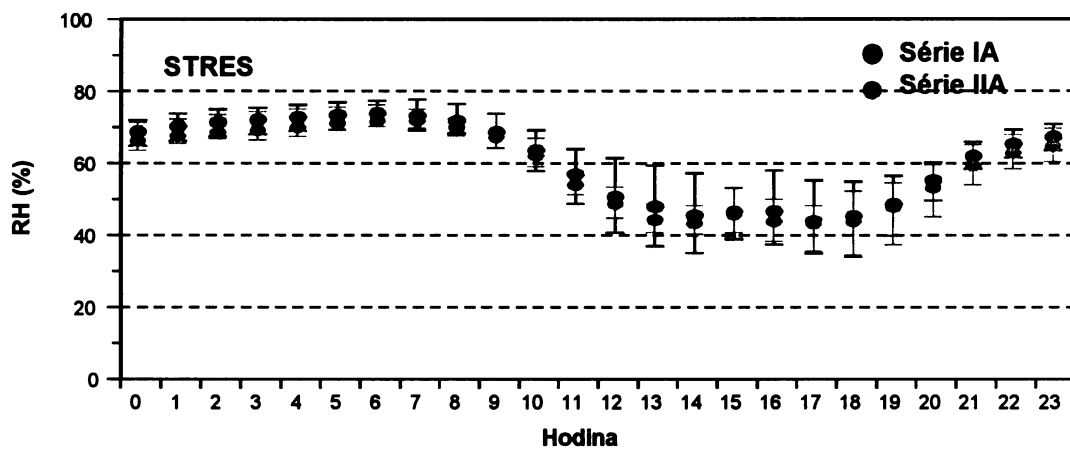
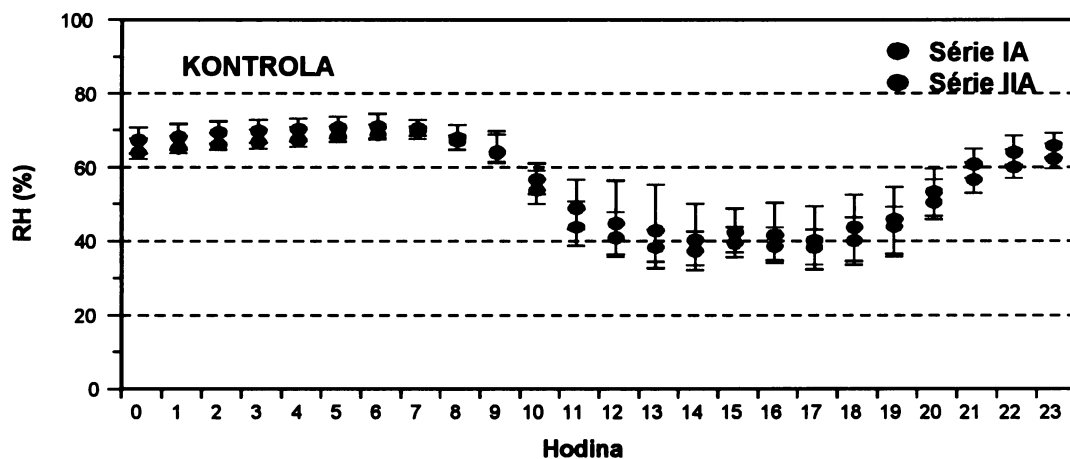
#### **4.1.1. Charakteristiky růstových podmínek**

Během provádění pokusů byly průběžně měřeny veličiny charakterizující vnější vlivy působící na rostliny během jejich růstu a vývoje. Naší snahou bylo, aby tyto podmínky byly pokud možno co nejpodobnější v obou sériích pokusů. Naměřené hodnoty jsou uvedeny formou grafů.

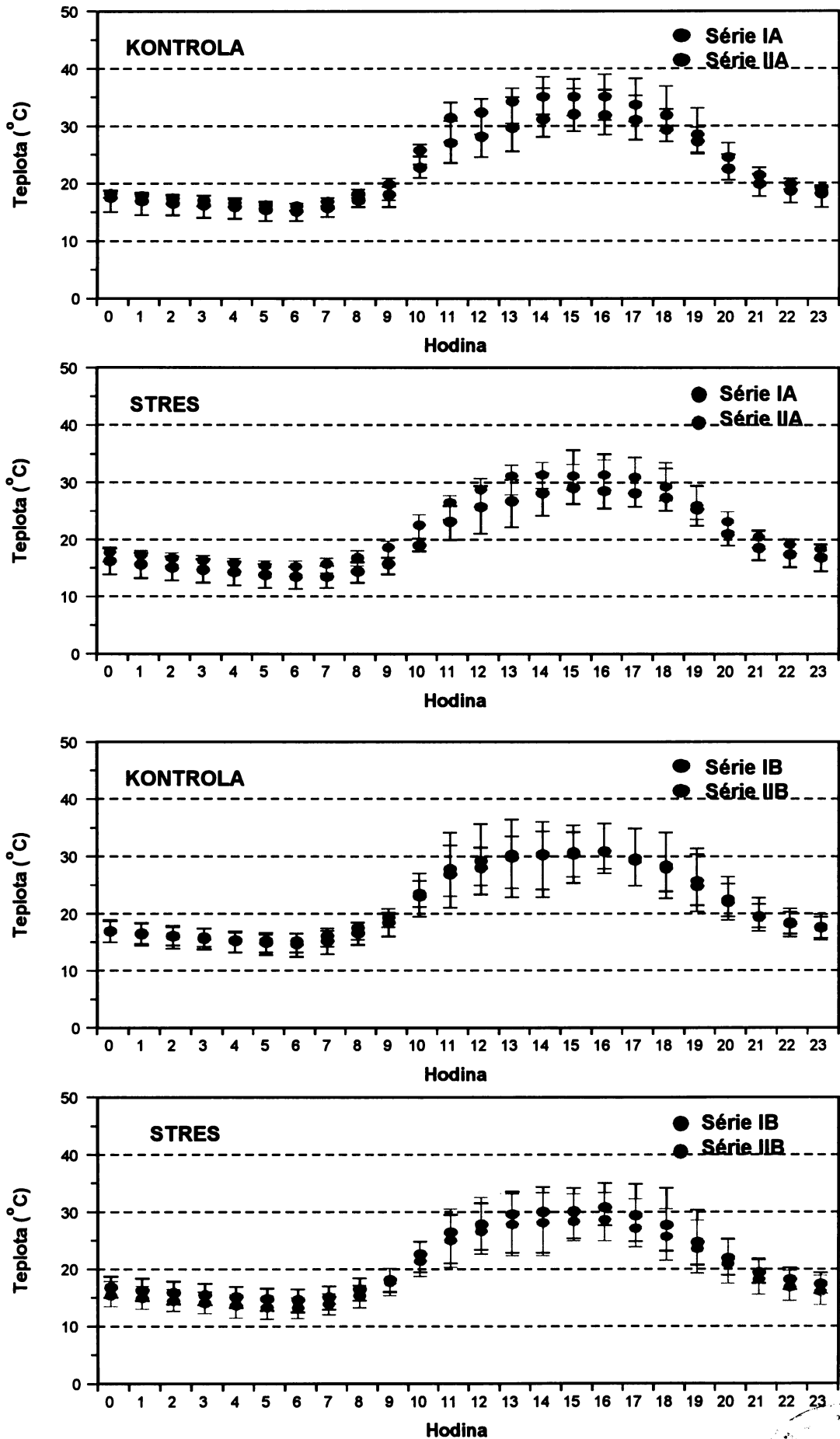
Na následujících grafech (graf 1. až 5.) jsou znázorněny změny veličin charakterizujících podmínky, za kterých byly pokusy prováděny. Jedná se o relativní vlhkost vzduchu (ve sklenících), teplotu vzduchu (ve sklenících), koncentraci O<sub>2</sub> ve vodě v bazénech, pH vody v bazénech a teplotu vody v bazénech, půdě v květináčích (6 cm pod povrchem) a vzduchu.



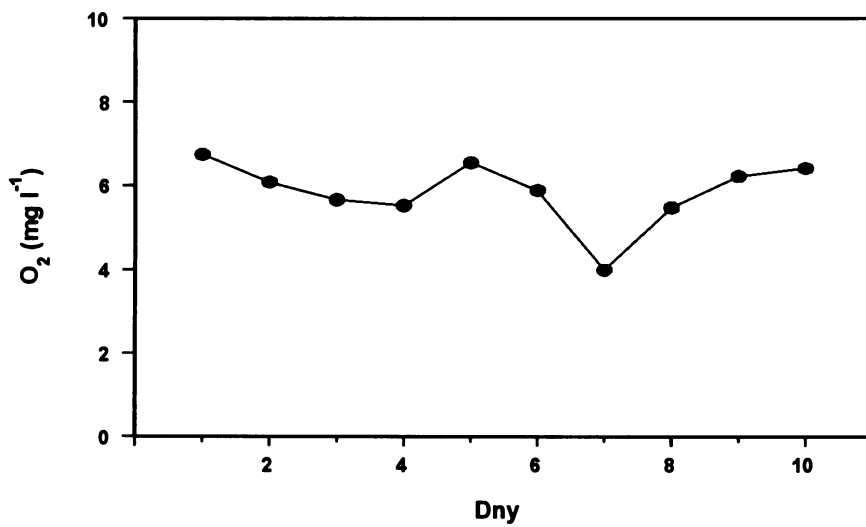
Graf.1. Relativní vlhkost vzduchu (průměr, maximum a minimum).



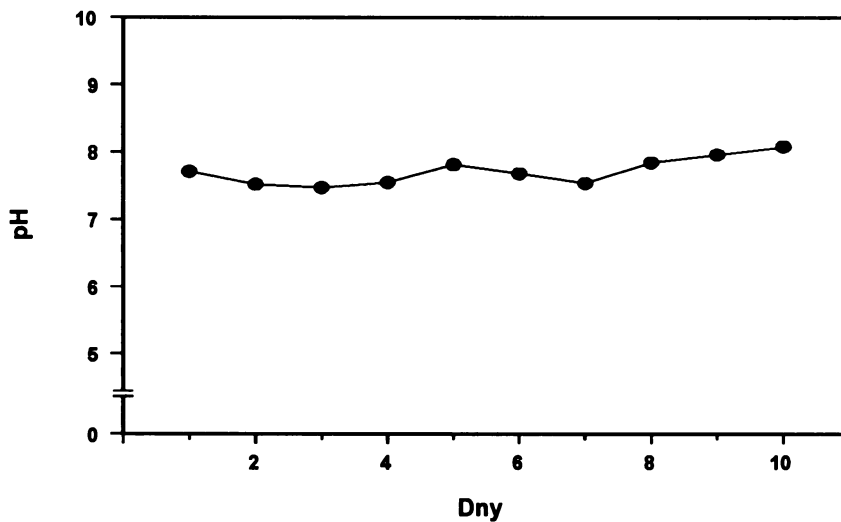
Graf. 2. Teplota vzduchu (průměr, maximum a minimum).



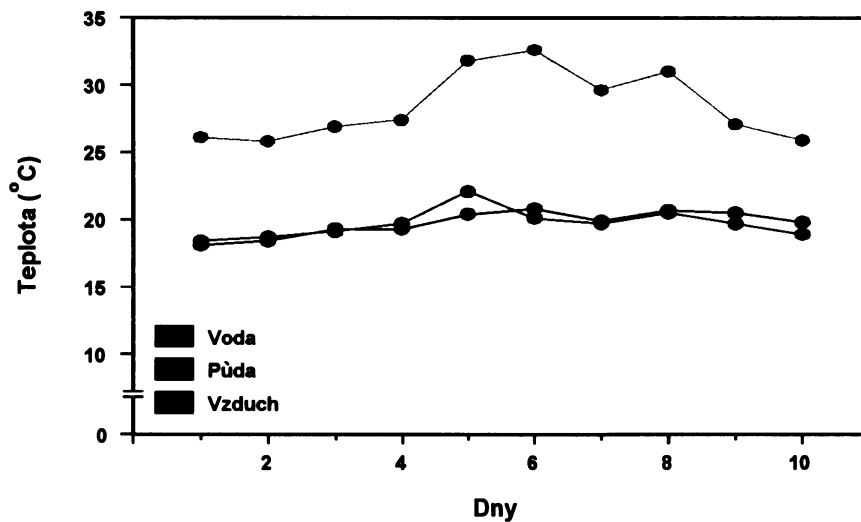
Graf.3. Koncentrace O<sub>2</sub> ve vodě v bazénech – průměr.



Graf. 4. pH vody v bazénech – průměr.



Graf.5. Teplota vody v bazénech, půdy v květináčích (6 cm pod povrchem) a vzduchu.



#### 4.1.2. Morfologické charakteristiky a vzhled rostlin

V průběhu pokusů byly měřeny růstové charakteristiky rostlin a zaznamenáván vývoj jednotlivých částí rostlin (internodia, listy) - zvlášť pro obě pokusné série i pro oba druhy stresů (hypoxie/posthypoxie). Data byla sbírána v týdenních intervalech. Pomocí získaných dat bylo možno postihnout kondici jednotlivých rostlin a jejich vzájemné srovnání (rostliny kontrolní x rostliny vystavené působení stresu). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v následujících tabulkách. Zvýrazněné rámečky (tučné orámování) značí období ve kterém došlo k odebrání pokusného materiálu. Zvýrazněné rámečky (vyznačené celé pole) značí období ve kterém byly rostliny vystaveny působení hypoxického stresu.

Tab. 1. Charakteristiky kontrolních rostlin v pokusné sérii I a pokusu hypoxický (A) i posthypoxický (B) stres. (výsev 9. - 12.3.2004)

23.-26.3.	1. list plně dorostlý, 2. list dorostlý pouze u některých rostlin. Všechny listy zelené.
30.3.-2.4.	1. a 2. listy plně dorostlé. Všechny listy zelené.
6.-9.4.	1. až 3. listy plně dorostlé. Některé rostliny začínají u báze červenat..
13.-16.4.	1. až 3. listy plně dorostlé, 4. list většinou také (ne u 2023). 1. list někdy žlutý, žloutnoucí nebo s uschlou špičkou, ostatní listy zelené.
20.-23.4.	1. až 4. listy plně dorostlé, 5. list především u 704. 1. list u některých rostlin suchý, ostatní listy zelené. Ve středním žeburu „bílá linka“.
27.-30.4.	1. až 4. listy plně dorostlé, 5. list většinou také (ne u 2023). 1. list suchý, 2. list suchý či zasychající, 3. list u některých rostlin zasychající špička, ostatní listy zelené. Od 4. listu výše pruhování kolem cévních svazků (nevýrazné), ve středním žeburu „bílá linka“. Rostliny nejsou u báze červené.
4.-7.5.	1. až 5. listy většinou plně dorostlé, 6. list jen u 704. 1. a 2. listy suché, 3. suchý či zasychající, ostatní listy zelené. Od 4. listu výše pruhování kolem cévních svazků (nevýrazné), ve středním žeburu „bílá linka“. Někdy (zejména u 704) na listech léze (hnědé skvrny).
10.-13.5.	1. až 5. listy plně dorostlé, většinou i 6. list, 7. list jen u 704. 1. až 2. listy suché, 3. suchý nebo zasychající, 4. list zasychající špička, ostatní listy zelené. Od 4. listu výše pruhování kolem cévních svazků.

Tab. 2. Charakteristiky kontrolních rostlin v pokusné sérii II a pokusu hypoxický (A) i posthypoxický (B) stres. (výsev 23. - 26.3.2004)

6.-9.4..	1. list plně dorostlý, 2. list dorostlý pouze u některých rostlin. Všechny listy zelené.
13.-16.4.	1. a 2. listy plně dorostlé, 3. list pouze u některých rostlin (genotyp 704). Všechny listy zelené.
20.-23.4	1. až 3. listy plně dorostlé.
27.-30.4.	1. až 3. listy plně dorostlé, 4. list většinou také (ne u 2023). 1. list někdy žlutý, žloutnoucí nebo s uschlou špičkou, ostatní listy zelené.
4.-7.5.	1. až 4. listy plně dorostlé, 5. list většinou také (ne u 2023). 1. list suchý nebo zasychající či žloutnoucí, ostatní listy zelené. Ve středním žeburu „bílá linka“.
11.-14.5.	1. až 4. listy plně dorostlé, 5. list většinou také, ne u 2023, u 704 i 6. list. 1. list suchý, 2. list u většiny rostlin suchý či zasychající, 3. list u některých rostlin zasychající špička, ostatní listy zelené. Od 4. listu výše pruhování kolem cévních svazků, ve středním žeburu „bílá linka“. Rostliny nejsou u báze červené.
18.-21.5.	1. až 5. listy většinou plně dorostlé, 6. list většinou také, ne u 2023, u 704 často i 7. list. 1. a 2. listy suché, 3. žloutnoucí či zasychající, ostatní listy zelené. Od 4. listu výše pruhování kolem cévních svazků (nevýrazné), ve středním žeburu „bílá linka“. Rostliny nejsou u báze příliš červené.
24.-27.5.	1. až 6. listy plně dorostlé, většinou i 7. list, (ne u 2023). 1. a 2. listy suché, 3. suchý nebo zasychající, ostatní listy zelené. Od 4. a výrazněji od 5. listu výše pruhování kolem cévních svazků, ve středním žeburu „bílá linka“. Rostliny nejsou u báze příliš červené.

Tab. 3. Charakteristiky pokusných rostlin v pokusné sérii I a pokusu hypoxický (A) i posthypoxický (B) stres. (výsev 9. - 12.3.2004)

23.-26.3.	1. list plně dorostlý, 2. list dorostlý pouze u některých rostlin. Všechny listy zelené.
30.3- .2.4.	1. a 2. listy plně dorostlé. Všechny listy zelené.
6.-9.4.	1. až 3. listy plně dorostlé. Špička 1. listu někdy začíná zasychat. Některé rostliny začínají u báze červenat.
13.-16.4.	1. až 3. listy plně dorostlé, 4. list pouze u 704. Špička 1. listu někdy začíná zasychat, nebo 1. list žloutne. Rostliny u báze červené (někdy až k 2. listu), především u 704.
20.-23.4.	1. až 4. listy plně dorostlé, 5. list pouze u 704. 1. list většinou suchý, někdy hnijící, 2. list často žlutý či žloutnoucí. Občas se u mladších listů začíná projevovat pruhování kolem cévních svazků, ve středním žeburu se objevuje „bílá linka“. Rostliny u báze červené.
27.-30.4.	1. až 4. listy plně dorostlé, 5. list většinou také, u 704 i 6. list. 1. a 2. listy suché, 3. list žloutnoucí, ostatní listy zelené (ale ve srovnání s kontrolou světlejší). Od 4. listu výše dosti výrazné pruhování kolem cévních svazků, ve středním žeburu „bílá linka“. Rostliny u báze červené.
4.-7.5.	1. až 5. listy plně dorostlé, 6. listy jen u 704. 1. až 3. listy suché, 4. někdy začíná žloutnout, ostatní listy zelené (ale ve srovnání s kontrolou světlejší). Od 4. listu výše dosti výrazné pruhování kolem cévních svazků, ve středním žeburu „bílá linka“. Někdy (zejména u 704) na listech léze (hnědé skvrny). Rostliny u báze červené, adventivní kořeny (vyrůstají nad povrchem země).
10.-13.5.	1. až 6. listy plně dorostlé, 7. listy jen u 704. 1. až 3. listy suché, 4. suché či zasychající, ostatní listy zelené (ale ve srovnání s kontrolou výrazně světlejší). Od 4. listu výše dosti výrazné pruhování kolem cévních svazků, ve středním žeburu „bílá linka“. Někdy (zejména u 704) na listech léze (hnědé skvrny). Rostliny u báze červené, adventivní kořeny (vyrůstají nad povrchem země).

Tab. 4. Charakteristiky pokusných rostlin v pokusné sérii II a pokusu hypoxický (A) i posthypoxický (B) stres. (výsev 23. - 26.3.2004)

6.-9.4.	1. list plně dorostlý, 2. list dorostlý pouze u některých rostlin. Všechny listy zelené.
13.-16.4.	1. a 2. listy plně dorostlé. Všechny listy zelené.
20.-23.4	1. až 3. listy plně dorostlé. Všechny listy zelené.
27.-30.4.	1. až 3. listy plně dorostlé, 4. list většinou také. Špička 1. listu někdy začíná zasychat, ostatní listy zelené.
4.-7.5.	1. až 4. listy plně dorostlé, 5. list většinou také, ne u 2023. 1. list většinou suchý, 2. list často žlutý či žloutnoucí, ostatní listy zelené. Obecně se u mladších listů začíná projevovat pruhování kolem cévních svazků, ve středním žebří se objevuje „bílá linka“. Rostliny u báze červené.
11.-14.5.	1. až 5. listy plně dorostlé, u 704 i 6. list. 1. a 2. listy suché, 3. list žloutnoucí či žlutý, ostatní listy zelené (ale ve srovnání s kontrolou světlejší). Od 4. listu výše dosti výrazné pruhování kolem cévních svazků, ve středním žebří „bílá linka“. Rostliny u báze červené.
18.-21.5.	1. až 5. listy plně dorostlé, 6. listy většinou také, 7. list jen u 704. 1. až 3. listy suché, 4. někdy začíná žloutnout, ostatní listy zelené (ale ve srovnání s kontrolou světlejší). Od 4. listu výše dosti výrazné pruhování kolem cévních svazků, ve středním žebří „bílá linka“. Rostliny u báze červené (až k 3. listu), adventivní kořeny (vyrůstají nad povrchem země).
24.-27.5.	1. až 6. listy plně dorostlé, 7. obvykle ne u 2023. 1. až 3. listy suché, 4. suché či zasychající, ostatní listy zelené (ale ve srovnání s kontrolou výrazně světlejší). Od 4. listu výše dosti výrazné pruhování kolem cévních svazků, ve středním žebří „bílá linka“. Rostliny u báze červené (až k 3—4. listu, někdy i výše), adventivní kořeny (vyrůstají nad povrchem země).

## 4.2. Funkční fotosyntetické charakteristiky chloroplastů

Získané výsledky byly nejprve hodnoceny analýzou variance trojného třídění s interakcemi, která umožnila postihnout všechny vlivy, působící na proměnlivost jednotlivých znaků, tj. vliv pokusné série (S), vliv genotypu (G) a vliv způsobu pěstování (P, stres/kontrola, obnova/kontrola) v rámci obou pokusů (A i B). Pokus (A) zahrnoval rostliny rostoucí v kontrolních a hypoxických podmínkách. Pokus (B) zahrnoval rostliny rostoucí v kontrolních a posthypoxických podmínkách. Dále byl hodnocen vliv interakcí jednotlivých faktorů  $G \times P$ ,  $G \times S$ ,  $P \times S$  a  $G \times P \times S$  na proměnlivost daných znaků.

Provedením této analýzy bylo zjištěno, že vliv pokusné série byl v pokusu A pro většinu charakteristik statisticky průkazný (tab. 5.). Pro pokus B byla statistická průkaznost zjištěna pouze pro hodnoty specifické suché hmotnosti (tab. 6.). Získaná data byla nadále v pokusu A i B hodnocena pro jednotlivé série odděleně, aby bylo možné podrobněji popsat vliv jednotlivých faktorů.

Dále byla použita analýza variance dvojného třídění s interakcemi, která umožnila podrobnější rozbor výsledků. V této analýze nebyl zahrnut vliv pokusné série (obě série byly hodnoceny odděleně) jakožto zdroje proměnlivosti a tudíž bylo možno postihnout charakter změn pod vlivem působení zdrojů proměnlivosti genotyp (G) a způsob pěstování (P, stres/kontrola, obnova/kontrola) a jejich vzájemnou interakci  $G \times P$  v jednotlivých sériích IA, IB a IIA, IIB.

Genotyp a způsob pěstování byly prokázány jako statisticky významný zdroj proměnlivosti u řady funkčních fotochemických charakteristik v obou sériích u obou pokusů. Statisticky průkazné interakce  $G \times P$  však nebyly zjištěny žádné (tab. 7., 8., 9., 10.).

Na závěr byla provedena analýza variance jednoduchého třídění odděleně pro zdroje proměnlivosti: způsob pěstování (P, stres/kontrola, obnova/kontrola) a genotyp (G) v jednotlivých sériích v rámci obou pokusů.

Pro zdroj proměnlivosti pěstování (P) byl zjištěn u genotypu 704 u hypoxického stresu, v obou sériích, průkazný rozdíl v chl  $\alpha$  (S), chl (LP) a poměru chl/kar (tab. 11. a 12.), v sérii I byl navíc průkazný rozdíl v PSI (LP), chl  $\alpha$  (LP), chl  $b$  (LP), chl (S) a

kar (LP), (tab.11.) a v sérii II byl navíc průkazný rozdíl v AHR (S) a AHR (chl), (tab.12.). U posthypoxického stresu byl u genotypu 704 v obou sériích průkazný rozdíl v PSI (LP), chl *b* (LP) a chl *b* (S) (tab.11. a 12.), v sérii I byl navíc průkazný rozdíl AHR (chl), PSI (S), chl *a* (LP), chl *a* (S), chl (LP), chl (S), kar (LP), kar (S), poměru chl *a/b* a poměru chl/kar (tab. 11.).

Pro genotyp 2023 byl zjištěn u hypoxického stresu průkazný rozdíl v chl *a* (S), chl *b* (LP), chl *b* (S), chl (LP), chl (S), kar (LP) a poměru chl/kar v obou sériích (tab.13. a 14.), v sérii II byl navíc průkazný rozdíl v AHR (chl), PSI (LP) a SpHm (tab.14.). U posthypoxického stresu byl u genotypu 2023 v obou sériích průkazný rozdíl v AHR (chl), PSI (LP), PSI (S), chl *a* (LP), chl *a* (S), chl *b* (LP), chl *b* (S), chl (LP) a chl (S), (tab.13. a 14.) a v sérii II navíc v poměru chl/kar (tab.14.).

V následujících tabulkách (tab. 5. až 18.) jsou uvedeny výsledky statistického zpracování dat získaných z měření funkčních fotosyntetických charakteristik rostlin. Uvedené zkratky znamenají : AHR - aktivita Hillovy reakce, PSI - aktivita fotosystému I, chl *a* – obsah chlorofylu *a*, chl *b* - obsah chlorofylu *b*, kar – obsah celkových karotenoidů, SpHm – specifická hmotnost listu, RWC - relativní obsah vody v listu, (LP) vztaženo na jednotku listové plochy, (S) - vztaženo na jednotku hmotnosti sušiny listu, (chl) - vztaženo na jednotkové množství chlorofylu.



Tab. 5. Výsledky **analýzy variance trojného třídění s interakcemi** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus A (stres)**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a S (série) a jejich vzájemné interakce, G x P, G x S, P x S, G x P x S. Statistická signifikance: p ≤ 5% \*, p ≤ 1% \*\*.

	G	P	S	G x P	G x S	P x S	G x P x S
AHR (LP)	0,025 *	0,174	0,113	0,624	0,782	0,320	0,351
AHR (S)	0,133	0,018 *	0,037 *	0,798	0,749	0,167	0,340
AHR (chl)	0,140	0 **	0,369	0,491	0,628	0,693	0,428
PSI (LP)	0,005 **	0 **	0,512	0,998	0,591	0,392	0,473
PSI (S)	0,177	0,065	0,221	0,687	0,737	0,234	0,483
PSI (chl)	0,038 *	0,050 **	0,364	0,703	0,341	0,663	0,799
chl a (LP)	0,005 **	0 **	0,016 *	0,449	0,638	0,070	0,305
chl a (S)	0,498	0 **	0,012 *	0,288	0,692	0,058	0,392
chl b (LP)	0,061	0 **	0,512	0,536	0,718	0,017 *	0,105
chl b (S)	0,582	0 **	0,128	0,323	0,944	0,030 *	0,238
chl (LP)	0,006 **	0 **	0,027 *	0,447	0,730	0,049 *	0,248
chl (S)	0,647	0 **	0,018 *	0,288	0,750	0,048 *	0,351
kar (LP)	0,080	0 **	0,893	0,983	0,646	0,232	0,739
kar (S)	0,915	0,430	0,218	0,585	0,665	0,097	0,630
chl a/b	0,010 **	0,575	0,003 **	0,416	0,246	0,592	0,818
chl/kar	0,109	0 **	0 **	0,106	0,657	0,176	0,154
SpHm	0,036 *	0 **	0,093	0,405	0,733	0,185	0,690
RWC	0,003 **	0,996	0,151	0,772	0,534	0,479	0,465

Tab. 6. Výsledky analýzy variance trojného třídění s interakcemi pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro pokus B (obnova). Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a S (série) a jejich vzájemné interakce, G x P, G x S, P x S, G x P x S. Statistická signifikance: p ≤ 5% \*, p ≤ 1% \*\*.

	G	P	S	G x P	G x S	P x S	G x P x S
AHR (LP)	0 **	0,009 **	0,573	0,736	0,032 *	0,829	0,745
AHR (S)	0,005 **	0,002 **	0,065	0,862	0,008 **	0,682	0,862
AHR (chl)	0 **	0 **	0,980	0,161	0,070	0,503	0,265
PSI (LP)	0,013 *	0 **	0,802	0,582	0,199	0,051	0,362
PSI (S)	0,794	0 **	0,302	0,682	0,270	0,111	0,370
PSI (chl)	0,004 **	0,455	0,985	0,736	0,325	0,130	0,648
chl a (LP)	0,450	0 **	0,665	0,674	0,652	0,276	0,593
chl a (S)	0,250	0 **	0,204	0,710	0,584	0,339	0,486
chl b (LP)	0,557	0 **	0,981	0,799	0,498	0,424	0,537
chl b (S)	0,200	0 **	0,379	0,843	0,444	0,467	0,432
chl (LP)	0,467	0 **	0,737	0,696	0,610	0,298	0,575
chl (S)	0,233	0 **	0,231	0,734	0,549	0,359	0,470
kar (LP)	0,927	0 **	0,678	0,606	0,649	0,174	0,800
kar (S)	0,017 *	0 **	0,275	0,550	0,583	0,227	0,596
chl a/b	0,709	0,014 *	0,263	0,881	0,582	0,467	0,905
chl/kar	0,287	0 **	0,269	0,915	0,814	0,749	0,534
SpHm	0 **	0,479	0,028 *	0,369	0,692	0,624	0,763
RWC	0,029 *	0,226	0,359	0,176	0,337	0,075	0,466

Tab. 7. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus A (stres)** a pokusnou sérii **I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a jejich vzájemné interakce, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
AHR (LP)	0,129	0,818	0,787
AHR (S)	0,253	0,495	0,657
AHR (chl)	0,285	0,016 *	0,953
PSI (LP)	0,023 *	0,002 **	0,613
PSI (S)	0,195	0,028 *	0,391
PSI (chl)	0,049 *	0,108	0,931
chl a (LP)	0,081	0 **	0,211
chl a (S)	0,822	0 **	0,142
chl b (LP)	0,188	0 **	0,193
chl b (S)	0,731	0 **	0,134
chl (LP)	0,084	0 **	0,191
chl (S)	0,912	0 **	0,132
kar (LP)	0,361	0,002 **	0,807
kar (S)	0,666	0,063	0,414
chl a/b	0,281	0,986	0,687
chl/kar	0,256	0 **	0,100
SpHm	0,090	0,104	0,387
RWC	0,147	0,690	0,564

Tab. 8. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus A (stres)** a pokusnou sérii **II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a jejich vzájemné interakce, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
AHR (LP)	0,088	0,056	0,228
AHR (S)	0,342	0,008 **	0,342
AHR (chl)	0,258	0 **	0,109
PSI (LP)	0,099	0,022 *	0,617
PSI (S)	0,511	0,655	0,847
PSI (chl)	0,392	0,262	0,651
chl a (LP)	0,030 *	0 **	0,851
chl a (S)	0,500	0,137	0,893
chl b (LP)	0,172	0 **	0,354
chl b (S)	0,672	0,030 *	0,891
chl (LP)	0,035 *	0 **	0,777
chl (S)	0,622	0,107	0,931
kar (LP)	0,126	0,034 *	0,825
kar (S)	0,837	0,568	0,967
chl a/b	0,014 *	0,438	0,459
chl/kar	0,218	0 **	0,830
SpHm	0,213	0,004 **	0,762
RWC	0,002 **	0,471	0,653

Tab. 9. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus B (obnova)** a pokusnou sérii **I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a jejich vzájemné interakce, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
AHR (LP)	0,091	0,045 *	0,993
AHR (S)	0,864	0,012 *	1
AHR (chl)	0,105	0,003 **	0,821
PSI (LP)	0,336	0 **	0,791
PSI (S)	0,596	0 **	0,763
PSI (chl)	0,107	0,522	0,524
chl a (LP)	0,828	0 **	0,936
chl a (S)	0,273	0 **	0,830
chl b (LP)	0,950	0 **	0,799
chl b (S)	0,212	0 **	0,714
chl (LP)	0,878	0 **	0,905
chl (S)	0,258	0 **	0,805
kar (LP)	0,794	0 **	0,850
kar (S)	0,050 *	0 **	0,962
chl a/b	0,195	0,016 *	0,698
chl/kar	0,548	0,006 **	0,600
SpHm	0,023 *	0,480	0,720
RWC	0,103	0,124	0,277

Tab. 10. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus B (obnova)** a pokusnou sérii **II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a jejich vzájemné interakce, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
AHR (LP)	0 **	0,093	0,652
AHR (S)	0,002 **	0,054	0,816
AHR (chl)	0,002 **	0,035 *	0,110
PSI (LP)	0,018 *	0,002 **	0,329
PSI (S)	0,273	0,003 **	0,299
PSI (chl)	0,022 *	0,167	0,940
chl a (LP)	0,406	0 **	0,509
chl a (S)	0,643	0,002 **	0,425
chl b (LP)	0,381	0 **	0,543
chl b (S)	0,664	0 **	0,426
chl (LP)	0,389	0 **	0,506
chl (S)	0,638	0 **	0,415
kar (LP)	0,709	0,001 **	0,601
kar (S)	0,190	0,005 **	0,436
chl a/b	0,925	0,098	0,988
chl/kar	0,379	0,020 *	0,726
SpHm	0,008 **	0,845	0,293
RWC	0,076	0,388	0,366

Tab. 11. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik u rostlin **genotypu 704** v pokusné **sérii I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 12. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik u rostlin **genotypu 704** v pokusné **sérii II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 11.

I 704	A/K	B/K
AHR (LP)	0,971	0,171
AHR (S)	0,841	0,101
AHR (chl)	0,064	0,028 *
PSI (LP)	0,020 *	0,002 **
PSI (S)	0,051	0,013 *
PSI (chl)	0,291	0,399
chl a (LP)	0,001 **	0,018 *
chl a (S)	0 **	0,006 **
chl b (LP)	0,002 **	0,009 **
chl b (S)	0 **	0,003 **
chl (LP)	0 **	0,005 **
chl (S)	0,001 **	0,015 *
kar (LP)	0,040 *	0,004 **
kar (S)	0,052	0,017 *
chl a/b	0,798	0,021 *
chl/kar	0,003 **	0,035 *
SpHm	0,610	0,809
RWC	0,890	0,250

Tab. 12.

II 704	A/K	B/K
AHR (LP)	0,058	0,079
AHR (S)	0,050 *	0,073
AHR (chl)	0,001 **	0,593
PSI (LP)	0,323	0,041 *
PSI (S)	0,897	0,075
PSI (chl)	0,418	0,341
chl a (LP)	0,392	0,079
chl a (S)	0,017 *	0,072
chl b (LP)	0,273	0,027 *
chl b (S)	0,001 **	0,035 *
chl (LP)	0,010 **	0,057
chl (S)	0,369	0,057
kar (LP)	0,253	0,051
kar (S)	0,785	0,103
chl a/b	0,983	0,269
chl/kar	0,001 **	0,259
SpHm	0,078	0,573
RWC	0,782	0,075

Tab. 13. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik u rostlin **genotypu 2023** v pokusné **sérii I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 14. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik u rostlin **genotypu 2023** v pokusné **sérii II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 13.

I 2023	A/K	B/K
AHR (LP)	0,770	0,157
AHR (S)	0,498	0,061
AHR (chl)	0,124	0,047 *
PSI (LP)	0,052	0,003 **
PSI (S)	0,303	0,014 *
PSI (chl)	0,229	0,998
chl a (LP)	0,063	0,011 *
chl a (S)	0,003 **	0,005 **
chl b (LP)	0,020 *	0,014 *
chl b (S)	0 **	0,005 **
chl (LP)	0,002 **	0,005 **
chl (S)	0,050 *	0,011 *
kar (LP)	0,017 *	0,003 **
kar (S)	0,480	0,006 **
chl a/b	0,761	0,214
chl/kar	0,001 **	0,093
SpHm	0,069	0,460
RWC	0,539	0,203

Tab. 14.

II 2023	A/K	B/K
AHR (LP)	0,559	0,449
AHR (S)	0,083	0,300
AHR (chl)	0,011 *	0,045 *
PSI (LP)	0 **	0,022 *
PSI (S)	0,243	0,024 *
PSI (chl)	0,324	0,332
chl a (LP)	0,079	0,009 **
chl a (S)	0,001 **	0,003 **
chl b (LP)	0,010 **	0,002 **
chl b (S)	0 **	0,001 **
chl (LP)	0,001 **	0,002 **
chl (S)	0,050 *	0,006 **
kar (LP)	0,046 *	0,011 *
kar (S)	0,333	0,030 *
chl a/b	0,219	0,231
chl/kar	0 **	0,005 **
SpHm	0,019 *	0,360
RWC	0,516	0,982

Tab. 15. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus A (stres)** v pokusné sérii I. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti G (genotyp). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 16. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus B (obnova)** v pokusné sérii I. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti G (genotyp). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 15.

I A	stres	kontrola
AHR (LP)	0,138	0,446
AHR (S)	0,223	0,655
AHR (chl)	0,458	0,457
PSI (LP)	0,038 *	0,245
PSI (S)	0,164	0,741
PSI (chl)	0,181	0,162
chl a (LP)	0,021 *	0,744
chl a (S)	0,302	0,306
chl b (LP)	0,022 *	0,993
chl b (S)	0,430	0,195
chl (LP)	0,018 *	0,783
chl (S)	0,321	0,257
kar (LP)	0,375	0,669
kar (S)	0,824	0,244
chl a/b	0,258	0,665
chl/kar	0,086	0,685
SpHm	0,610	0,028 *
RWC	0,247	0,417

Tab. 16.

I B	obnova	kontrola
AHR (LP)	0,280	0,195
AHR (S)	0,917	0,888
AHR (chl)	0,278	0,219
PSI (LP)	0,364	0,647
PSI (S)	0,837	0,627
PSI (chl)	0,124	0,491
chl a (LP)	0,841	0,923
chl a (S)	0,507	0,398
chl b (LP)	0,903	0,808
chl b (S)	0,515	0,291
chl (LP)	0,856	0,980
chl (S)	0,508	0,372
kar (LP)	0,715	0,965
kar (S)	0,100	0,240
chl a/b	0,559	0,202
chl/kar	0,563	0,908
SpHm	0,075	0,171
RWC	0,199	0,188

Tab. 17. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus A (stres)** v pokusné **sérii II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti ( $p$ ) pro zdroj proměnlivosti G (genotyp). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 18. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty funkčních fotosyntetických charakteristik pro **pokus B (obnova)** v pokusné **sérii II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti ( $p$ ) pro zdroj proměnlivosti G (genotyp). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 17.

II A	stres	kontrola
AHR (LP)	0,630	0,103
AHR (S)	1	0,242
AHR (chl)	0,669	0,117
PSI (LP)	0,444	0,118
PSI (S)	0,772	0,501
PSI (chl)	0,812	0,243
chl a (LP)	0,142	0,123
chl a (S)	0,556	0,720
chl b (LP)	0,777	0,076
chl b (S)	0,709	0,836
chl (LP)	0,183	0,115
chl (S)	0,677	0,786
kar (LP)	0,301	0,275
kar (S)	0,853	0,915
chl a/b	0,030 *	0,214
chl/kar	0,276	0,510
SpHm	0,514	0,284
RWC	0,024 *	0,030 *

Tab. 18.

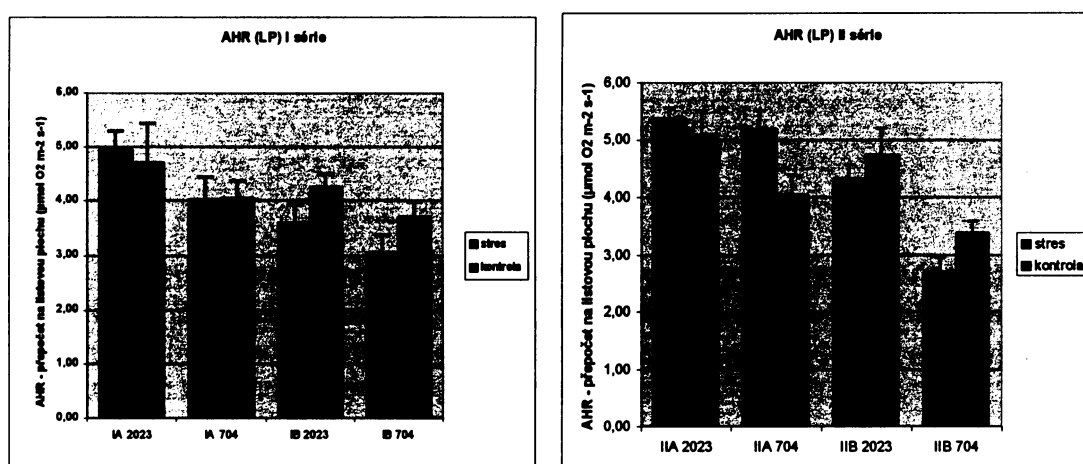
II B	obnova	kontrola
AHR (LP)	0,004 **	0,034 *
AHR (S)	0,010 **	0,059
AHR (chl)	0,012 *	0,086
PSI (LP)	0,257	0,041 *
PSI (S)	0,966	0,173
PSI (chl)	0,117	0,109
chl a (LP)	0,904	0,313
chl a (S)	0,402	0,809
chl b (LP)	0,822	0,374
chl b (S)	0,344	0,817
chl (LP)	0,885	0,318
chl (S)	0,381	0,808
kar (LP)	0,910	0,563
kar (S)	0,177	0,691
chl a/b	0,952	0,933
chl/kar	0,721	0,379
SpHm	0,024 *	0,188
RWC	0,448	0,117

Ze statistického hodnocení obsahu fotosyntetických pigmentů vyjádřených v přepočtu na jednotku listové plochy (LP) byly získány obdobné výsledky jako z hodnocení těchto charakteristik v přepočtu na jednotku suché hmotnosti (S). Reálnou situaci *in vivo* vystihuje přesněji přepočet na LP, proto přepočet na S není dále uváděn. Hodnoty obsahů chlorofylu *a* a *b* vyjádřené v přepočtu na LP a S nejsou uvedeny. Jaké jsou změny těchto charakteristik vyplývá z vyjádření obsahu chlorofylu *a+b* (přepočteno na LP) graf (12.), z poměru chlorofylu *a/b* (graf 13.) a z poměru celkového chlorofylu a celkových karotenoidů (graf 15.).

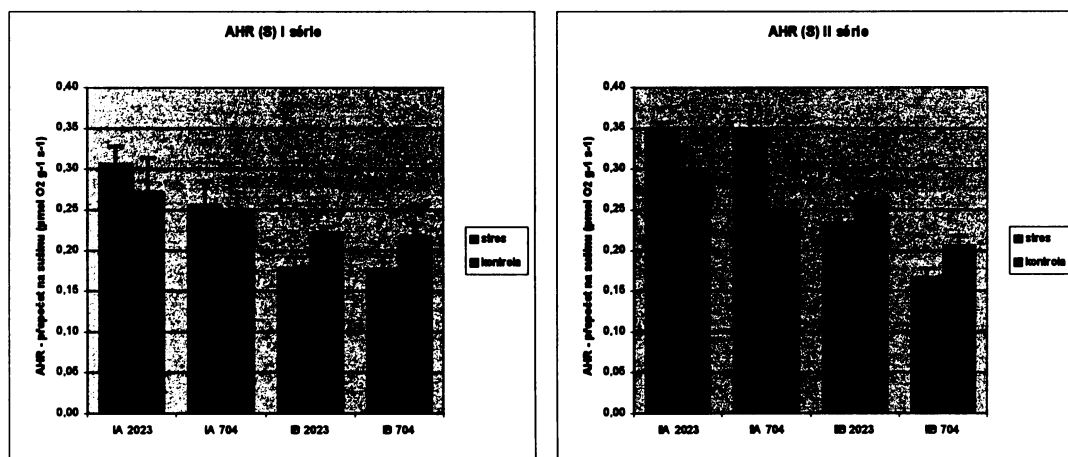


Na následujících grafech (graf 6. až 17.) jsou znázorněny výsledky získané z měření funkčních fotosyntetických charakteristik rostlin. Uvedené zkratky znamenají : AHR - aktivita Hillovy reakce, PSI - aktivita fotosystému I, chl *a* – obsah chlorofylu *a*, chl *b* - obsah chlorofylu *b*, kar – obsah celkových karotenoidů, SpHm – specifická hmotnost listu, RWC - relativní obsah vody v listu, (LP) vztaženo na jednotku listové plochy, (S) - vztaženo na jednotku hmotnosti sušiny listu, (chl) - vztaženo na jednotkové množství chlorofylu.

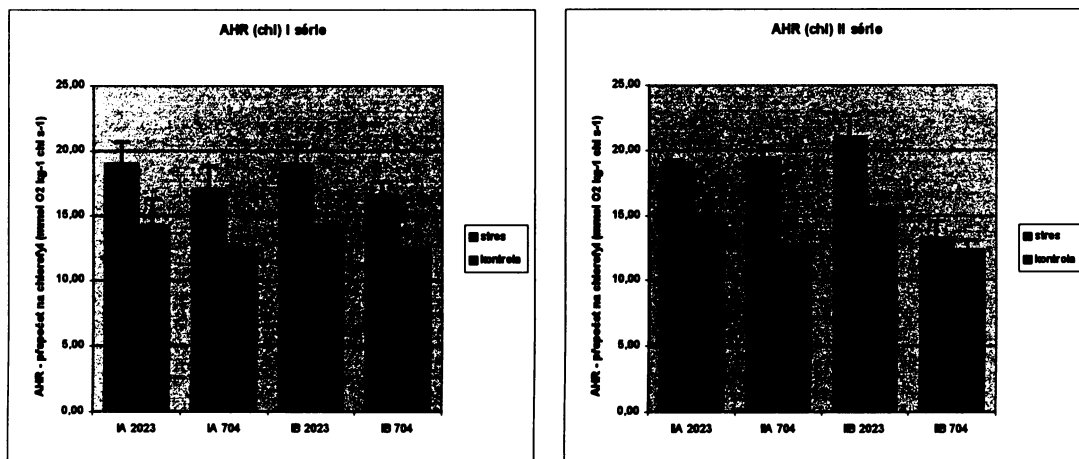
Graf 6. Aktivita fotosystému 2 (AHR) vyjádřená v přepočtu na jednotku listové plochy (LP) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



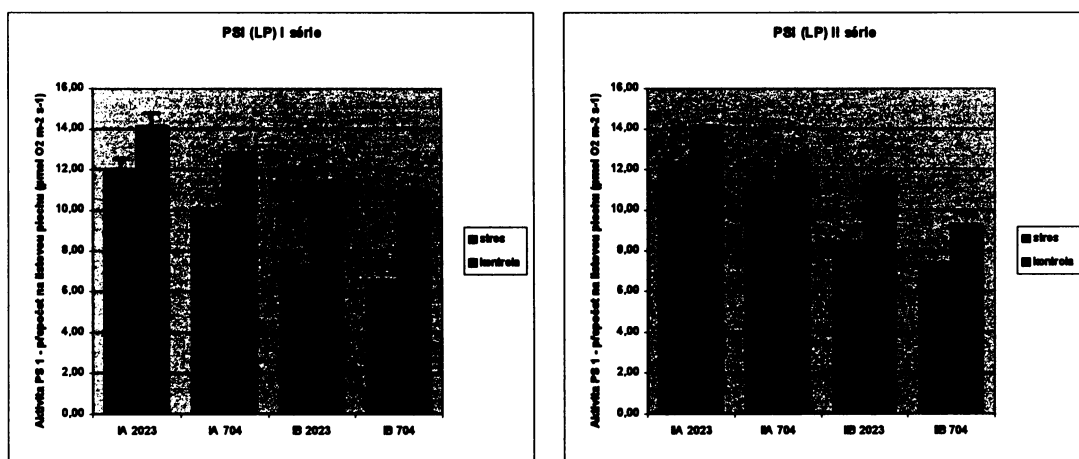
Graf 7. Aktivita fotosystému 2 (AHR) vyjádřená v přepočtu na jednotku suché hmotnosti listové čepele (S) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



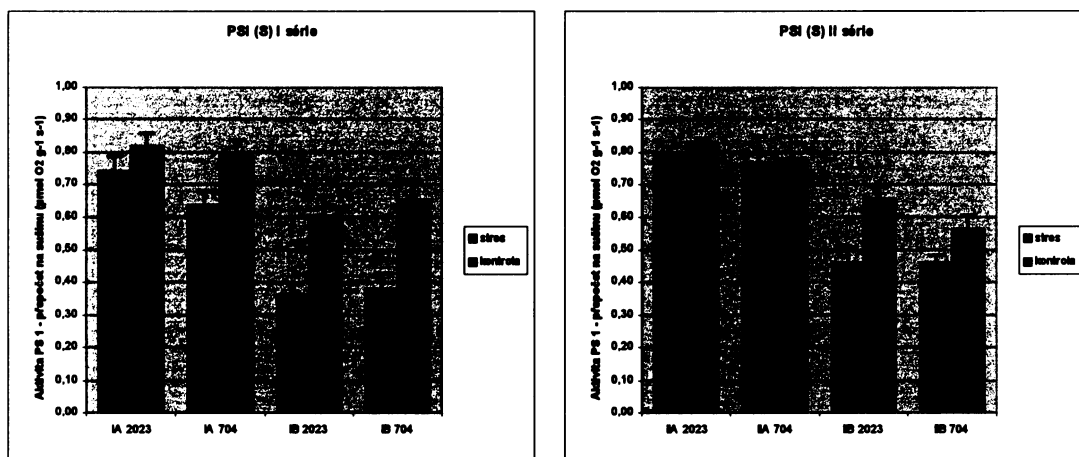
Graf 8. Aktivita fotosystému 2 (AHR) vyjádřená v přepočtu na jednotku obsahu chlorofylu (chl) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



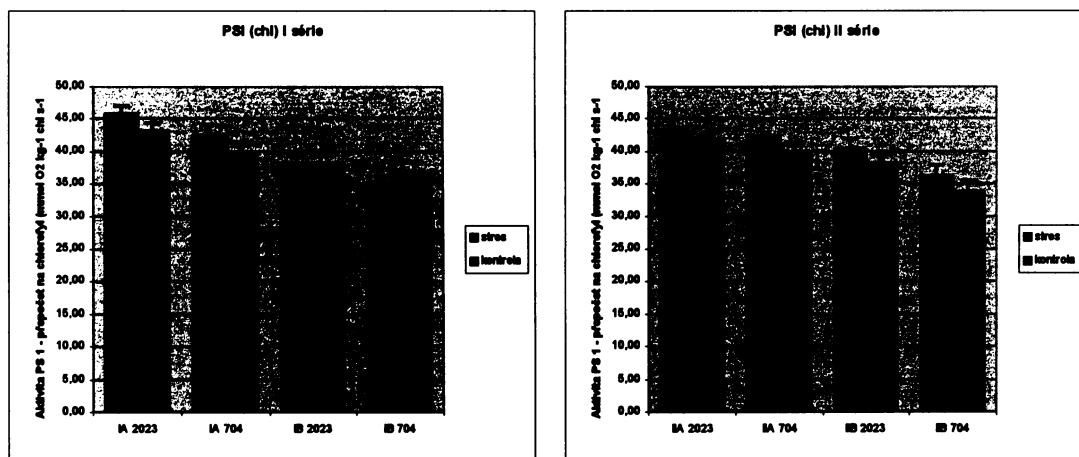
Graf 9. Aktivita fotosystému I (PSI) vyjádřená v přepočtu na jednotku listové plochy (LP) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



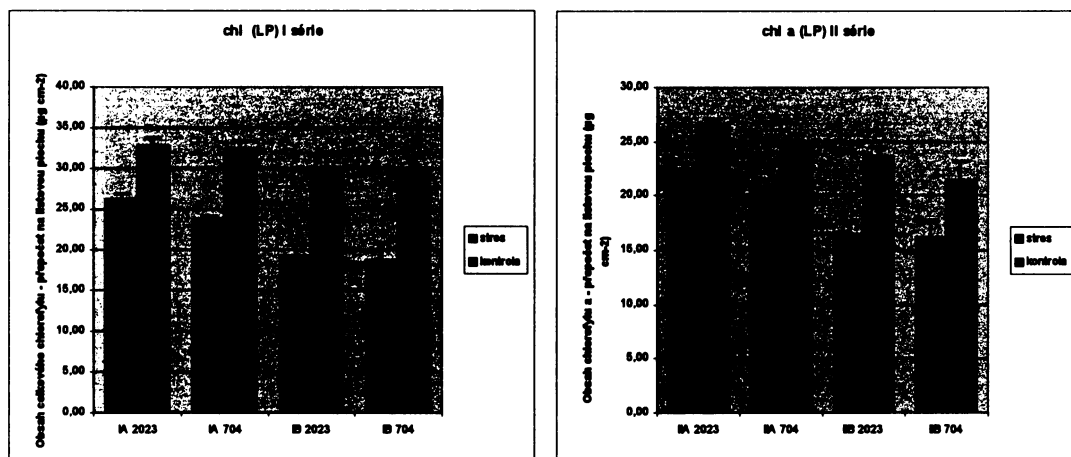
Graf 10. Aktivita fotosystému I (PSI) vyjádřená v přepočtu na jednotku suché hmotnosti listové čepele (S) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



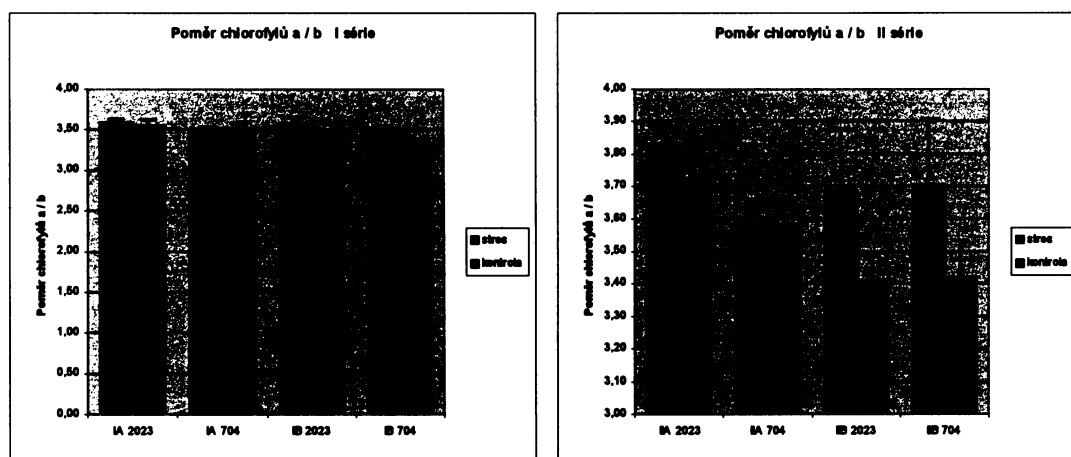
Graf 11. Aktivita fotosystému I (PSI) vyjádřená v přepočtu na jednotku obsahu chlorofylu (chl) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



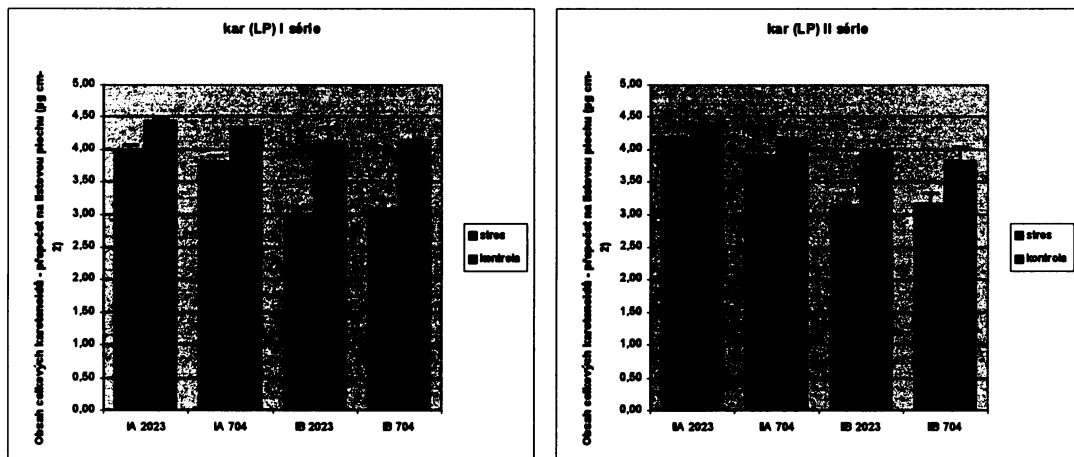
Graf 12. Obsah chlorofylu  $a+b$  vyjádřený v přepočtu na jednotku listové plochy (LP) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



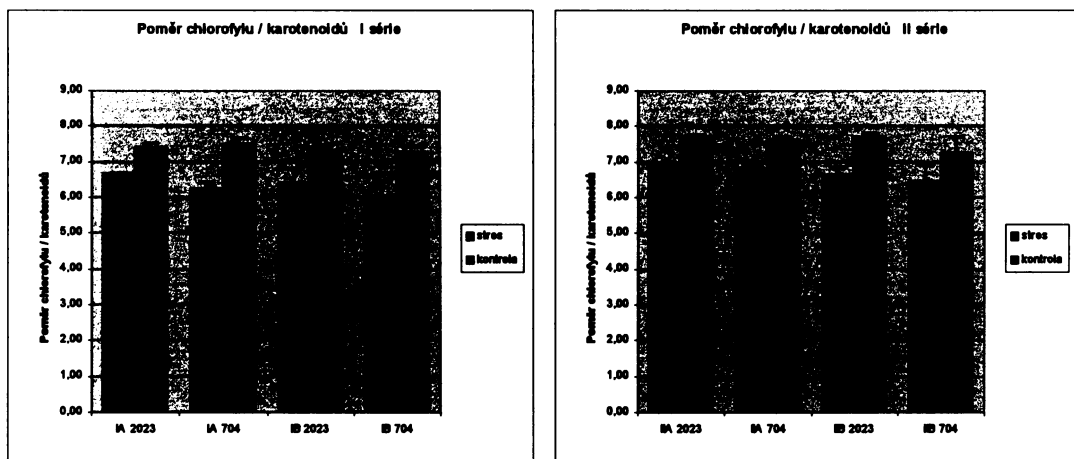
Graf 13. Poměr chlorofylů  $a$  a  $b$  pro rostliny pěstované v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



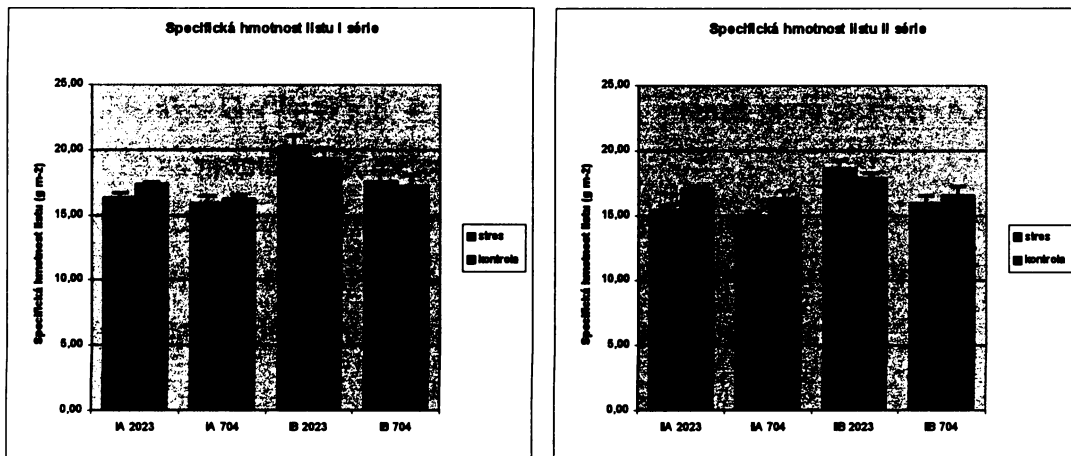
Graf 14. Obsah celkových karotenoidů (kar) vyjádřený v přepočtu na jednotku listové plochy (LP) v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



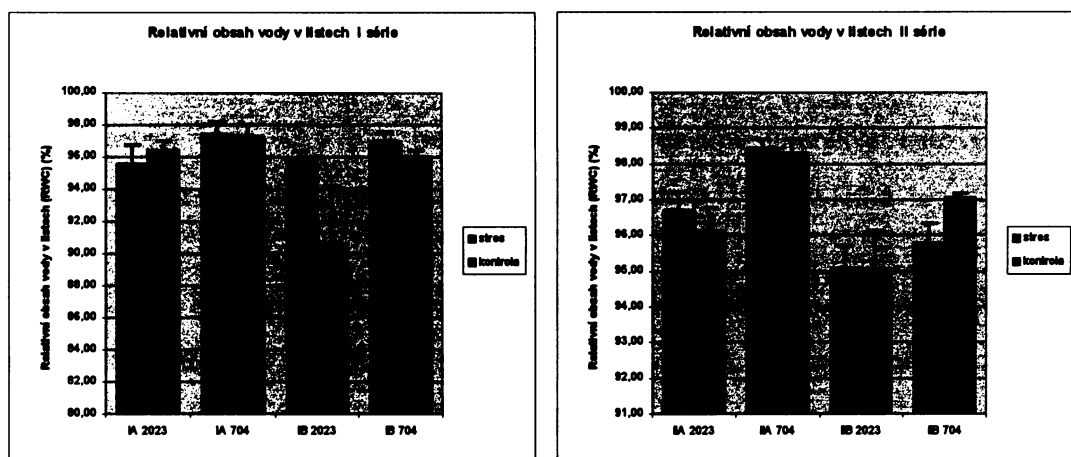
Graf 15. Poměr celkového chlorofylu a celkových karotenoidů pro rostliny pěstované v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



Graf 16. Specifická hmotnost listu pro rostliny pěstované v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



Graf 17. Relativní obsah vody v listech pro rostliny pěstované v obou pokusných sériích (I, II), pro oba pokusy (A i B) – srovnání kontrolních rostlin s rostlinami pod vlivem stresu, u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



### 4.3. Ultrastrukturní charakteristiky chloroplastů

Pro statistické hodnocení průkaznosti rozdílů hodnot ultrastrukturních charakteristik chloroplastů byla stejně jako při hodnocení funkčních fotochemických charakteristik použita analýza variance trojného třídění s interakcemi k posouzení vlivů série (S), genotypu (G) a způsobu pěstování (P, stres/kontrola, obnova/kontrola) a jejich interakcí  $G \times P$ ,  $G \times S$ ,  $P \times S$  a  $G \times P \times S$ , v rámci obou pokusů (A,B) v obou sériích (I,II) na proměnlivost měřených znaků.

Provedením této analýzy bylo zjištěno, že vliv pokusné série v obou pokusech (A i B) byl pro většinu charakteristik statisticky vysoce průkazný (tab. 19. a 20.) a proto byla získaná data nadále hodnocena pro jednotlivé série odděleně.

Dále byla použita analýza variance dvojného třídění s interakcemi, která umožnila podrobnější rozbor výsledků. V této analýze nebyl zahrnut vliv pokusné série (obě série byly hodnoceny odděleně) jakožto zdroje proměnlivosti a tudíž bylo možno postihnout charakter změn pod vlivem působení zdrojů proměnlivosti genotyp (G) a způsob pěstování (P, stres/kontrola, obnova/kontrola) a jejich vzájemnou interakci  $G \times P$  v jednotlivých sériích IA, IB a IIA, IIB.

Genotyp a způsob pěstování byly prokázány jako statisticky významný zdroj proměnlivosti u řady ultrastrukturních charakteristik v obou pokusech v obou sériích. Statisticky průkazné interakce  $G \times P$  pro objemovou hustotu plastoglobulů byly v obou sériích zjištěny u pokusu B (obnova) (tab. 22.). V sérii II byla u pokusu A (stres) statisticky průkazná interakce v poměru délky řezu chloroplastem ku šířce řezu chloroplastem (tab. 23.) a u pokusu B byly průkazné interakce také v množství intergranálních tylakoidů, tylakoidů celkově a v poměru D/S (tab. 24.).

Nakonec byla provedena analýza variance jednoduchého třídění odděleně pro zdroje proměnlivosti: způsob pěstování (P, stres/kontrola, obnova/kontrola) a genotyp (G) v jednotlivých sériích v rámci obou pokusů.

Pro zdroj proměnlivosti pěstování (P) byla zjištěna u genotypu 704 průkazně vyšší objemová hustota plastoglobulů u rostlin stresovaných než u rostlin kontrolních, v obou sériích v obou pokusech (tab. 25. a 26.). Dále byl u rostlin pěstovaných v hypoxickém prostředí průkazný rozdíl v D/S (poměr délky a šířky řezu

chloroplastem) - menší poměr (kulatější chloroplasty), v sérii II (tab. 26.), u rostlin ovlivněných posthypoxickým stresem byl tento rozdíl průkazný v sérii I (tab. 25.), ale v opačném smyslu (plošší chloroplasty). V sérii IIB byla navíc u stresovaných rostlin větší objemová hustota periferního retikula (tab. 26.). U genotypu 2023 byla také vyšší objemová hustota plastoglobulů u rostlin stresovaných než u rostlin kontrolních, ale jen v sérii I, v sérii IIA byl tento rozdíl neprůkazný, v sérii IIB průkazný, ale v opačném smyslu (tab. 27. a 28.). Poměr D/S – větší poměr byl průkazný u posthypoxického stresu v obou sériích (tab. 27. a 28.). V sérii IB bylo průkazně více periferního retikula (tab. 27). V sérii IIB bylo průkazně více granálních i všech tylakoidů a méně stromatu, což samozřejmě souvisí s množstvím tylakoidů (tab. 28.).

Pro zdroj proměnlivosti genotyp (G) bylo zjištěno, že u genotypu 704 je u stresovaných rostlin v sérii IA průkazně vyšší granalita chloroplastů než u genotypu 2023 (tab. 29.). V sérii IIA byly zjištěny průkazné rozdíly mezi genotypy v objemové hustotě plastoglobulů a poměru D/S (tab. 31.). U kontrolních variant nebyly v pokusu A žádné průkazné rozdíly zjištěny (tab. 29. a 31.). V pokusu B byly mezi genotypy průkazné rozdíly, u stresovaných rostlin v obou sériích v objemové hustotě granálních tylakoidů a plastoglobulů (tab. 30. a 32.). V sérii IB byly navíc rozdíly mezi genotypy v granalitě a množství stromatu (tab. 30.) a v sérii IIB v intergranálních tylakoidech, tylakoidech celkově a v poměru D/S (tab. 32.). U kontrolních rostlin v sérii IB byl průkazný rozdíl v objemové hustotě granálních a všech tylakoidů a objemové hustotě stromatu (tab. 30.), v sérii IIB byl průkazný rozdíl v poměru D/S (tab. 32.).

V následujících tabulkách (tab. 19. až 32.) jsou uvedeny výsledky statistického zpracování dat získaných z měření ultrastrukturních charakteristik chloroplastů. Uvedené zkratky znamenají : TG – tylakoidy granální [%], TI - tylakoidy intergranální [%], TC – tylakoidy celkově [%], G – granalita [%], PG – plastoglobuly [%], PR – periferní retikulum [%], S – stroma [%], D/S – délka řezu chloroplastem/šířka řezu chloroplastem. TG, TI, PG, PR a S jsou objemové hustoty (relativní parciální objemy),  $TC = TG+TI$ ,  $G = TG/TC$ . D a S byly měřeny na přibližně mediálních řezech chloroplasty.



Tab. 19. Výsledky **analýzy variance trojného třídění s interakcemi** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus A (stres)**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a S (série) a jejich vzájemné interakce, G x P, G x S, P x S, G x P x S. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	S	G x P	G x S	P x S	G x P x S
TG	0,122	0,210	0 **	0,906	0,339	0,311	0,544
TI	0,253	0,662	0 **	0,996	0,736	0,677	0,328
TC	0,599	0,463	0 **	0,921	0,578	0,282	0,896
G	0,047 *	0,212	0 **	0,842	0,279	0,600	0,303
PG	0,005 **	0 **	0,032 *	0,345	0,058	0,043 *	0,542
PR	0,532	0,450	0 **	0,306	0,164	0,704	0,050 *
S	0,365	0,905	0 **	0,994	0,290	0,679	0,532
D/S	0,414	0,573	0,120	0,043 *	0,011 *	0,056	0,028 *

Tab. 20. Výsledky **analýzy variance trojného třídění s interakcemi** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus B (obnova)**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp), P (pěstování) a S (série) a jejich vzájemné interakce, G x P, G x S, P x S, G x P x S. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	S	G x P	G x S	P x S	G x P x S
TG	0,670	0,754	0 **	0,185	0 **	0,052	0,227
TI	0,972	0,695	0 **	0,048 *	0,822	0,618	0,111
TC	0,153	0,622	0 **	0,023 *	0,002 **	0,226	0,052
G	0,115	0,803	0 **	0,432	0,022 *	0,203	0,936
PG	0 **	0 **	0,808	0 **	0,201	0,022 *	0,170
PR	0,584	0,001 **	0 **	0,656	0,974	0,965	0,327
S	0,002 **	0,151	0 **	0,238	0,002 **	0,494	0,112
D/S	0,132	0 **	0,502	0 **	0,165	0,196	0,002 **

Tab. 21. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus A (stres)** a pokusnou sérii I. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp) a P (pěstování) a jejich vzájemnou interakci, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
TG	0,041*	0,063	0,549
TI	0,173	0,985	0,368
TC	0,373	0,137	0,979
G	0,021 *	0,180	0,352
PG	0,496	0 **	0,801
PR	0,121	0,771	0,465
S	0,100	0,803	0,602
D/S	0,013 *	0,065	0,894

Tab. 22. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus B (obnova)** a pokusnou sérii I. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp) a P (pěstování) a jejich vzájemnou interakci, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
TG	0 **	0,124	0,934
TI	0,850	0,916	0,698
TC	0,001 **	0,227	0,808
G	0,006 **	0,268	0,603
PG	0,002 **	0 **	0,016 *
PR	0,729	0,024 *	0,338
S	0 **	0,587	0,768
D/S	0,934	0 **	0,678

Tab. 23. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus A (stres)** a pokusnou sérii II. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp) a P (pěstování) a jejich vzájemnou interakci, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
TG	0,710	0,879	0,760
TI	0,633	0,613	0,560
TC	0,985	0,830	0,886
G	0,544	0,631	0,582
PG	0,002 **	0,006 **	0,288
PR	0,615	0,458	0,053
S	0,925	0,742	0,695
D/S	0,245	0,365	0,006 **

Tab. 24. Výsledky **analýzy variance dvojného třídění s interakcemi** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus B (obnova)** a pokusnou sérii **II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroje proměnlivosti G (genotyp) a P (pěstování) a jejich vzájemnou interakci, G x P. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

	G	P	G x P
TG	0,126	0,233	0,067
TI	0,881	0,608	0,041 *
TC	0,205	0,613	0,004 **
G	0,616	0,482	0,553
PG	0 **	0,018 *	0 **
PR	0,666	0,011 *	0,690
S	0,962	0,143	0,057
D/S	0,035 *	0 **	0 **

Tab. 25. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik u rostlin **genotypu 704** v pokusné sérii **I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 26. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik u rostlin **genotypu 704** v pokusné sérii **II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 25.

I 704	A/K	B/K
TG	0,379	0,273
TI	0,522	0,829
TC	0,274	0,305
G	0,774	0,660
PG	0 **	0 **
PR	0,443	0,368
S	0,846	0,557
D/S	0,204	0 **

Tab. 26.

II 704	A/K	B/K
TG	0,761	0,639
TI	0,455	0,115
TC	0,824	0,099
G	0,455	0,409
PG	0,010 **	0 **
PR	0,380	0,039 *
S	0,970	0,767
D/S	0,007 **	0,473

Tab. 27. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik u rostlin **genotypu 2023** v pokusné **sérii I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 28. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik u rostlin **genotypu 2023** v pokusné **sérii II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti P (pěstování). A/K (stres/kontrola), B/K (obnova/kontrola). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 27.

I 2023	A/K	B/K
TG	0,081	0,283
TI	0,529	0,742
TC	0,316	0,497
G	0,109	0,275
PG	0 **	0,028 *
PR	0,769	0,02 *
S	0,590	0,860
D/S	0,175	0,001 **

Tab. 28.

II 2023	A/K	B/K
TG	0,908	0,040 *
TI	0,955	0,196
TC	0,952	0,014 *
G	0,962	0,930
PG	0,221	0,044*
PR	0,069	0,127
S	0,535	0,014 *
D/S	0,204	0 **

Tab. 29. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus A (stres)** v pokusné **sérii I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti G (genotyp). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 30. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus B (obnova)** v pokusné **sérii I**. Uvedeny jsou hladiny významnosti (p) pro zdroj proměnlivosti G (genotyp). Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 29.

I A	stres	kontrola
TG	0,072	0,290
TI	0,105	0,746
TC	0,510	0,546
G	0,043 *	0,261
PG	0,546	0,737
PR	0,152	0,503
S	0,120	0,437
D/S	0,081	0,075

Tab. 30.

I B	obnova	kontrola
TG	0,011 *	0,005 **
TI	0,902	0,616
TC	0,060	0,006 **
G	0,027 *	0,095
PG	0,003 **	0,426
PR	0,707	0,264
S	0,003 **	0,002 **
D/S	0,774	0,743

Tab. 31. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus A (stres)** v pokusné sérii **II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti ( $p$ ) pro zdroj proměnlivosti **G (genotyp)**. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 32. Výsledky **analýzy variance jednoduchého třídění** pro hodnoty stereologických charakteristik pro **pokus B (obnova)** v pokusné sérii **II**. Uvedeny jsou hladiny významnosti ( $p$ ) pro zdroj proměnlivosti **G (genotyp)**. Statistická signifikance:  $p \leq 5\%$  \*,  $p \leq 1\%$  \*\*.

Tab. 31.

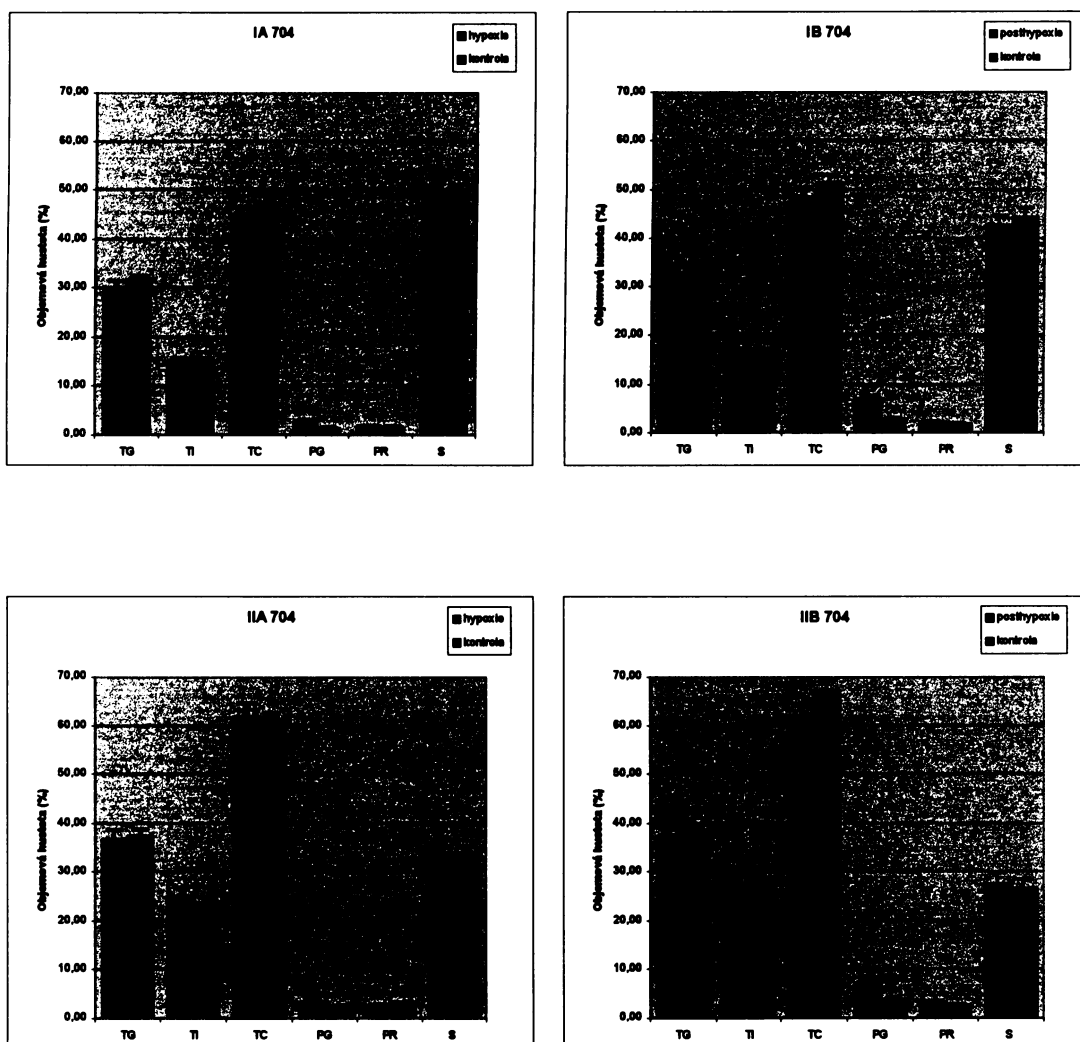
II A	stres	kontrola
TG	0,966	0,600
TI	0,945	0,421
TC	0,936	0,894
G	0,970	0,379
PG	0,005 **	0,117
PR	0,100	0,289
S	0,756	0,814
D/S	0,013 *	0,197

Tab. 32.

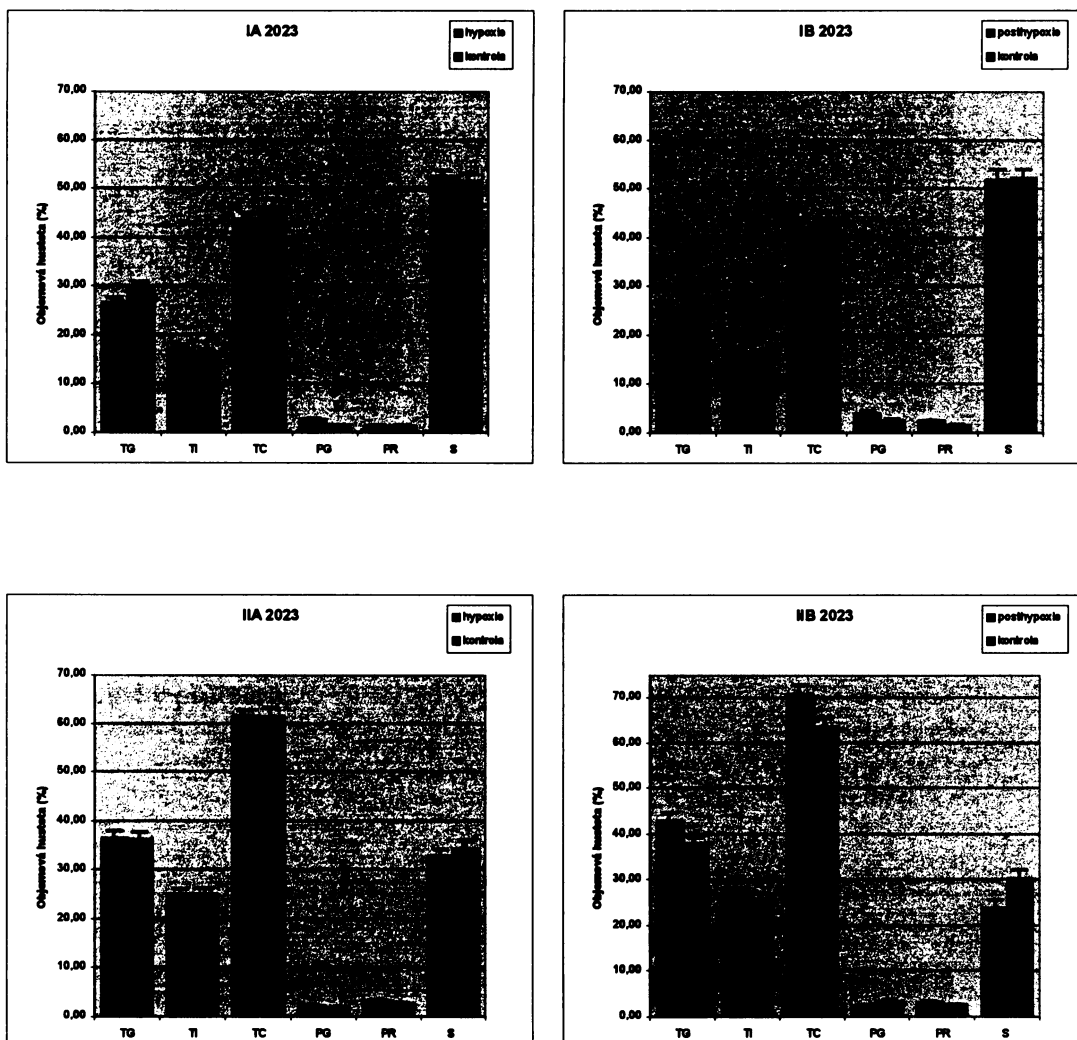
II B	obnova	kontrola
TG	0,038 *	0,798
TI	0,031 *	0,251
TC	0,004 **	0,209
G	0,813	0,486
PG	0 **	0,606
PR	0,669	0,982
S	0,185	0,146
D/S	0 **	0,005 **

Na následujících grafech jsou znázorněny výsledky kvantitativního hodnocení jednotlivých ultrastrukturních charakteristik chloroplastů. Data jsou znázorněna zvlášť pro jednotlivé genotypy, genotyp 704 a genotyp 2023, pro jednotlivé pokusné série (pokusná série I a II) a pro jednotlivé pokusy (pokus A – hypoxický stres a pokus B – posthypoxický stres). Uvedené zkratky znamenají : TG – tylakoidy granální [%], TI – tylakoidy intergranální [%], TC – tylakoidy celkově [%], PG – plastoglobuly [%], PR – periferní retikulum [%], S – stroma [%] a D/S – délka řezu chloroplastem/šířka řezu chloroplastem. TG, TI, PG, PR a S jsou objemové hustoty (relativní parciální objemy),  $TC = TG + TI$ ,  $G = TG/TC$ . D a S byly měřeny na přibližně mediáních řezech chloroplasty.

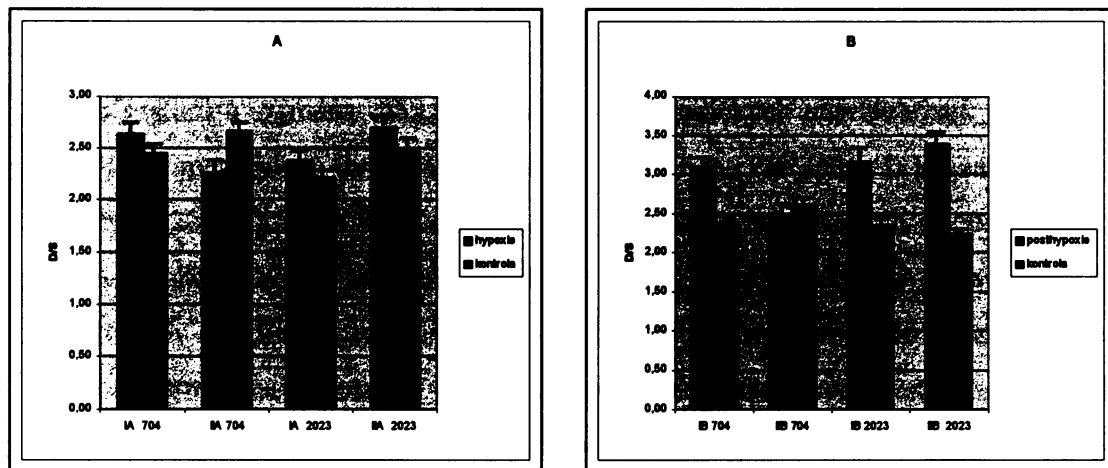
Graf 18. Objemové hustoty ultrastrukturálních kompartmentů chloroplastů v obou pokusných sériích (I a II) pro oba pokusy (A i B) u genotypu 704. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



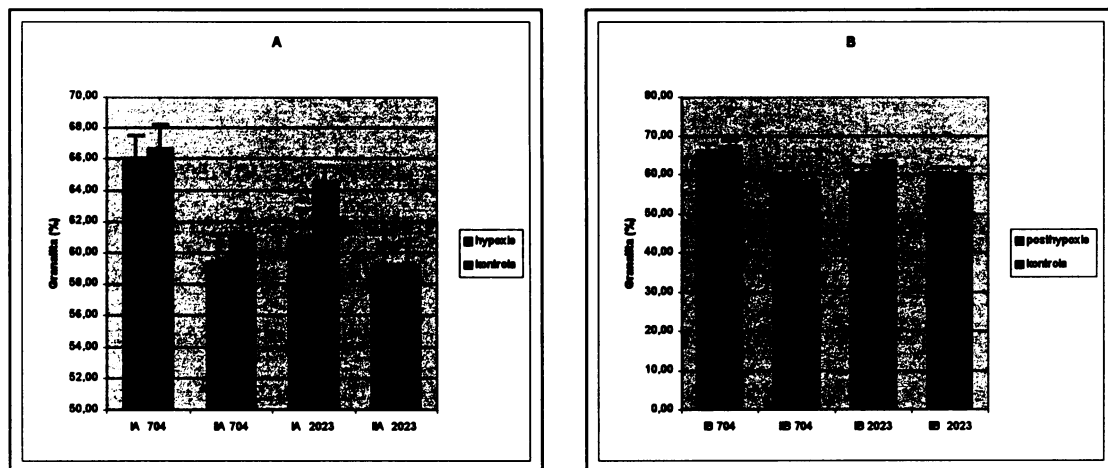
Graf 19. Objemové hustoty ultrastrukturních kompartmentů chloroplastů v obou pokusných sériích (I a II) pro oba pokusy (A i B) u genotypu 2023. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



Graf 20. Poměr délky a šířky řezu chloroplastem (D/S) u obou sérií (I a II) v obou pokusech (A i B) u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.



Graf 21. Granalita chloroplastů u obou sérií (I a II) v obou pokusech (A i B) u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023). Uvedeny jsou průměrné hodnoty a jejich střední chyby průměru.





## 5. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo studium funkčních fotosyntetických charakteristik chloroplastů (aktivita Hillovy reakce a aktivita fotosystému I, obsah chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů a jejich vzájemné poměry, relativní obsah vody v listech a jejich specifická suchá hmotnost), morfologických charakteristik rostlin (délka listů, výška rostlin) a zejména ultrastrukturních stereologických charakteristik chloroplastů v buňkách mezofylu u dvou inbredních linií kukuřice (*Zea mays* L.), genotypu 704 a genotypu 2023, které byly pěstovány v optimálních a hypoxických podmínkách - při zaplavení kořenového systému. Dále byly porovnávány jednotlivé parametry i u kontrolních rostlin a stresovaných rostlin navrácených po devítidenní periodě působení stresu na dvacet dní do optimálních podmínek - posthypoxický stres. Pokus byl proveden ve dvou opakováních, pokusná série I a pokusná série II. Problematikou působení hypoxického stresu na nadzemní nezaplavené části rostlin se zabývalo jen málo autorů, vlivem na chloroplasty zejména Wample a Davis (1983), Hurng a Kao (1993), Daugherty *et al.* (1994), Ladygin (1999, 2004) a Bragina *et al.* (2004). Problematikou působení posthypoxického stresu na chloroplasty se nezabýval nejspíše nikdo. Působení hypoxického/posthypoxického stresu kořenového systému na morfologii, ultrastrukturu a funkci fotosyntetického aparátu není tudíž dostatečně probádáno.

### 5.1. Morfologické charakteristiky a vzhled rostlin

Porovnáním pokusných rostlin s rostlinami kontrolními bylo zjištěno, že délka listů studovaných rostlin byla menší u pokusných rostlin. Pokusné rostliny i na pohled vykazovaly horší kondici. Negativní ovlivnění růstu souvisí s působením hypoxického/posthypoxického stresu kořenového systému, tento jev byl již dříve pozorován (Bragina *et al.* 2004). Soudí se, že zpomalení růstu je obecnou reakcí na hypoxické podmínky.

Během prvních pěti dnů působení stresu bylo u pokusných rostlin pozorováno červení bází stonků (především u genotypu 704). Devátý den působení stresu byla již odezva rostlin komplexnější. Stonky pokusných rostlin byly červené, což může být průvodním jevem hromadění antokyanů v pletivech. 1. list byl suchý nebo hnijící, což

je zřejmě způsobeno urychlenou senescencí tohoto listu. Bragina *et al.* (2004) pozorovaly u rostlin kukuřice ovlivněné hypoxickým stresem předčasnou senescenci. Tento jev byl pozorován i v našich pokusech. 2. list byl žlutý či žloutnoucí, v těchto listech dochází ke chloróze způsobené nejspíše degradací chlorofylu, tento jev popisuje ve své práci prováděné na hrachu setém Ladygin (1999). Hurng a Kao (1993) pozorovali u rostlin tabáku nižší obsah chlorofylu už po dvou dnech zaplavení kořenů. Chloróza může být způsobena nejen degradací chlorofylu, ale také nedostatečnou syntézou chlorofylu nového, tento případ je popsán v práci Ladygin (2004), hypoxický stres byl v Ladyginových pokusech spojen ještě s působením stresu z nedostatku železa. U mladších listů našich rostlin se objevilo pruhování kolem cévních svazků a ve středním žeburu se objevila bílá linka. Tato bílá linka byla pozorována i u kontrolních rostlin. V prvním týdnu po ukončení působení stresu začal 3. list žloutnout a ostatní listy byly světleji zelené než listy kontrolních rostlin. Tato odezva stresovaných rostlin je způsobena degradací chlorofylu nebo jeho nedostatečnou syntézou jak už bylo uvedeno výše.

## 5.2. Specifická hmotnost listu a funkční fotosyntetické charakteristiky chloroplastů

**Specifická hmotnost listu** byla u pokusných rostlin po působení hypoxického stresu nižší než u rostlin kontrolních (v obou pokusných sériích u obou genotypů), avšak pouze ve II. sérii u genotypu 2023 byl tento rozdíl statisticky průkazný. Stejný efekt, snížení specifické hmotnosti listu po působení hypoxického stresu, pozorovali Daugherty *et al.* (1994) u rostlin *Brassica rapa*. Po působení posthypoxického stresu byla specifická hmotnost listu nižší u rostlin kontrolních, u genotypu 2023 v obou pokusných sériích a u genotypu 704 v I. pokusné sérii. Žádný z těchto rozdílů však nebyl statisticky průkazný. Tento jev může mít spojitost s tím, že v důsledku působení hypoxického stresu došlo u všech pokusných rostlin, s výjimkou rostlin v I. sérii u genotypu 2023, ke zvýšení **relativního obsahu vody** (žádný z těchto rozdílů však nebyl statisticky průkazný). Avšak stejnou odezvu vykazovaly rostliny po působení stresu posthypoxického s výjimkou genotypu 704 ve II. pokusné sérii (ani zde však nebyl žádný z těchto rozdílů statisticky průkazný). Tento jev je v rozporu s údaji vyskytujícími se v literatuře (uvádí se, RWC se během působení hypoxie většinou

nezvyšuje, o posthypoxii žádné informace uvedeny nejsou). Přesto se lze domnívat, že pokles specifické hmotnosti listu může být způsoben zvýšením relativního obsahu vody v listu. Po působení posthypoxického stresu došlo u pokusných rostlin ke zvýšení jak specifické hmotnosti listu tak i relativního obsahu vody (s výjimkou genotypu 704 ve II. pokusné sérii). To může být způsobeno tím, že rostliny byly na stresové podmínky již adaptovány a vykazovaly již normální růst. Tento jev, obnovení růstové kondice rostlin po delším působení stresu, pozorovaly ve svých pokusech např. Bragina *et al.* (2004).

**Množství fotosyntetických pigmentů, chlorofylu *a* a *b*,** po působení hypoxického i posthypoxického stresu u pokusných rostlin výrazně kleslo ve všech případech, většinou průkazně. Pokles množství fotosyntetických pigmentů (chlorofylu *a* a *b*) také odpovídá údajům uváděným v literatuře, např. Hurng a Kao (1993), Daugherty *et al.* (1994), Ladygin (1999, 2004), naopak Bragina *et al.* (2004) pozorovaly u rostlin kukuřice po zaplavení trvajícím 5 až 8 dní zvýšení obsahu pigmentů, tento nárůst byl ale neprůkazný. Pokles mnou zjištěný byl výraznější po působení posthypoxického stresu. Poměr chl *a/b* byl výrazně vyšší u stresovaných rostlin (hypoxický i posthypoxický stres) než u rostlin kontrolních, s výjimkou genotypu 704 v I. pokusné sérii ovlivněné hypoxickým stresem. Ke zvýšení poměru chl *a/b* došlo v důsledku výraznějšího snižování chl *b* oproti chl *a*. Moje výsledky potvrzují hypotézu, že působení posthypoxického stresu ovlivňuje rostliny více než působení stresu hypoxického (VanToai a Bolles 1991, Crawford a Braendle 1996 a Beamelt *et al.* 1998). V případě působení jiných stresů (stres sucha, nadměrná salinita) na fotosyntetické pigmenty byly pozorovány stejné odezvy rostlin, jako po působení posthypoxického stresu, a to významné snížení obsahu chlorofylů, zvýšení poměru chl *a/b* v důsledku snižování obsahu chl *b*. Po působení těchto stresů jsou změny ve složení pigmentů zřejmě důsledkem působení silného fotooxidačního stresu. To bylo prokázáno na základě údajů o zvýšené aktivaci enzymů zneškodňujících ROS během těchto typů stresu. Je zajímavé, že u takovýchto typů stresů dochází vždy k výraznějšímu poklesu chl *b* oproti chl *a*. To může být způsobeno větším zastoupením chl *b* v PSII, který je za stresu více poškozován působením ROS než PSI. Míra degradace (nebo snížení syntézy) chl *b* a zvýšení poměru chl *a/b* může být ukazatelem míry působení fotooxidačního stresu. V tomto případě by výsledky uvedené v této práci byly v souladu se studiemi, které dokumentují menší poškození

rostlin fotoinhibicí při hypoxii. Oproti tomu poškození rostlinných funkcí při posthypoxii je větší v porovnání s přímým působením stresu v důsledku fotooxidace (VanToai a Bolles 1991, Crawford a Braendle 1996 a Beamelt *et al.* 1998). Z toho lze usuzovat, že zvyšování poměru chl *a/b* může souviset s aktivací enzymů zneškodňujících ROS. Nejednoznačné údaje uváděné v literatuře mohou být způsobeny tím, že pokusy zaměřené na studium působení hypoxického stresu byly prováděny za nestejných podmínek, zejména pokud jde o délku trvání zaplavení. Dalšími faktory ovlivňujícími prováděný pokus jsou například teplota nebo míra ozáření. S prodlužující se dobou trvání zaplavení dochází k prohlubování negativních vlivů působících na rostliny. Vlivem hypoxie zřejmě dochází k menšímu poškození rostlinných funkcí vlivem fotooxidace, tedy nižší produkci ROS, a proto není v časných fázích trvání stresu aktivován komplex enzymů zneškodňujících ROS (VanToai a Bolles 1991). Při dlouhodobějším působení hypoxie se již fotooxidační efekty zesilují (VanToai a Bolles 1991), jsou aktivovány antioxidační enzymy a dochází ke zvýšení poměru chl *a/b*.

Množství chlorofylů a míru jejich syntézy (degradace) během stresu je nutné brát v souvislosti s množstvím pigment-proteinových světlosběrných komplexů (Holá 1999). Chlorofyl *b* se vyskytuje pouze v pigment-proteinových komplexech vnějších světlosběrných antén, zatímco chlorofyl *a* je vázán jak na reakční centra, tak na vnější i vnitřní světlosběrné antény obou fotosystémů. Snižování obsahu chlorofylu *a* tedy může být způsobeno jak snižováním počtu reakčních center, tak i snižováním počtu světlosběrných antén. K tomuto druhému jevu dochází častěji, neboť pokles obsahu chl *b* je výraznější. Avšak Ladygin (1999) předpokládá, že častěji dochází ke snížení počtu reakčních center než ke změně pigment-proteinových komplexů, což odporuje teorii o lepší ochraně PSII, který je více náchylný k fotooxidaci než PSI.

**Množství karotenoidů** pod vlivem působení hypoxického/posthypoxického stresu výrazně kleslo, pouze s výjimkou hypoxického stresu ve II. pokusné sérii, ve většině případů byl tento pokles statisticky průkazný. Výraznější pokles byl zaznamenán po působení posthypoxického stresu, což potvrzuje teorii, že rostliny jsou více ovlivněny působením posthypoxického stresu než působením stresu hypoxického.

Ve všech případech také došlo ke snížení **poměru celkových chlorofylů ke karotenoidům** a to ve většině případů statisticky průkazně. Působení hypoxického

stresu způsobuje výraznější destrukci chlorofylu oproti karotenoidům, ke stejným závěrům dospěl i Ladygin (2004). Stejný vliv na rostliny má zřejmě i posthypoxický stres.

Vlivem hypoxického/posthypoxického stresu nedošlo u pokusných rostlin ve většině případů k průkazným změnám v aktivitě **fotosystému II – PSII**, **aktivita Hillovy reakce**. V literatuře se uvádí že PSII je mnohem citlivější k působení hypoxického/posthypoxického stresu než PSI a to v důsledku zvýšené degradace proteinu D1, ovlivněné především fotooxidací. Aktivita Hillovy reakce, kterou lze charakterizovat jako fotosyntetické uvolňování kyslíku za současné redukce umělého akceptoru elektronů, je v tomto případě ukazatelem míry aktivity PSII, protože proteiny komplexu vyvíjejícího kyslík jsou chemicky buď přímo nebo zprostředkovaně vázány na protein D1. Tento protein je po působení hypoxického/posthypoxického stresu většinou nejvíce poškozen. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že krátkodobý hypoxický stres nemá výrazný negativní vliv na aktivitu PSII, nebo také, že působení fotoinhibičního efektu v důsledku stresu zaplavením přinejmenším v krátkém časovém intervalu není tak intenzivní, jako u ostatních typů stresu ( např. po působení stresu sucha nebo stresu způsobeného nadměrnou salinitou).

Ze získaných dat je zřejmé, že rozdíly mezi hodnotami fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů mezi stresovanými a kontrolními rostlinami závisejí na způsobu přepočtu (AHR/LP/S/chl). Přepočet AHR na LP a AHR na S dal téměř ve všech případech stejné výsledky, až na rozdíl v I. sérii, u genotypu 704 po působení hypoxického stresu, zatímco při přepočtu AHR (LP/S) a AHR (chl) se výsledky lišily ve všech případech. Přepočet AHR (LP/S) je zřejmě výhodnější pro porovnávání vnitrodruhových rozdílů fotochemických charakteristik než přepočet AHR (chl), protože lépe odpovídá situaci *in vivo*. Tato domněnka je prezentována i v některých literárních pramenech. Ale i po přepočtu AHR (LP/S) mohou být výsledky někdy zkreslené. Přepočet AHR (LP) může být ovlivněn například změnou tloušťky listu a při přepočtu AHR (S) musí být brán zřetel na možný vliv změny RWC, který se v průběhu působení stresu může měnit. Pro vyjádření aktivity PSII je ve většině případů používán přepočet AHR na jednotkové množství chlorofylu. Hodnoty AHR (chl) závisejí na množství fotosyntetických pigmentů v listu. Množství fotosyntetických pigmentů však během působení stresu výrazně klesá, jak již bylo diskutováno výše. Pokles obsahu fotosyntetických pigmentů má za následek zvýšení

absolutní hodnoty AHR (chl). Z prováděných měření (přepočteno na chl) je možné shrnout, že po působení hypoxického stresu se průměrné hodnoty AHR ve většině případů zvýšily, nebo se od kontrolních hodnot příliš nelišily. Z toho lze usuzovat, že hypoxický stres ovlivňuje aktivitu PSII méně, než je tomu při působení jiných stresorů (např. působení amitrolu, Pechová *et al.* 2003). Díky získaným výsledkům lze předpokládat, že během působení hypoxie/posthypoxie není množství funkčních komplexů PSII ovlivněno. Ladygin (2004) však ve svých pokusech pozoroval snížení počtu reakčních center PS v souvislosti se zvětšením LHC antény. Ladygin (1999) vysvětluje snížení aktivity PSII, na základě provedených pokusů, předpokladem, že dochází ke snížení počtu reakčních center a ne ke změně pigment-proteinových komplexů. Pokusy prováděné Ladyginem však probíhaly na rostlinách hrachu, mnohem citlivějších k deficienci O<sub>2</sub>, než je kukuřice, jež byla použita v mých pokusech. Kukuřice se řadí mezi rostliny středně citlivé k hypoxickému/posthypoxickému stresu, zatímco hrách patří mezi rostliny velmi citlivé.

AHR se při přepočtu na LP a S mezi stresovanými a kontrolními rostlinami nikdy průkazně nelišila ( s výjimkou hypoxického stresu u genotypu 704 ve II. sérii, kde byly rozdíly na hranici průkaznosti). Zato při přepočtu AHR na chl byla u stresovaných rostlin vždy vyšší, většinou průkazně. Z toho lze vyvozovat, že PSII, uskutečňující Hillovu reakci, je za hypoxického i posthypoxického stresu výkonnější, než u kontrolních rostlin.

Aktivita **fotosystému I – PSI** byla ve většině případů vyšší u kontrolních rostlin oproti rostlinám stresovaným, při přepočtu na LP a S, v některých případech i průkazně. Při přepočtu na chl byly pozorovány rozdíly různé, všude však neprůkazné. Pokles aktivity PSI byl většinou výraznější po působení posthypoxického stresu. V literatuře se objevuje, že PSI je méně citlivý k účinkům různých abiotických stresů než PSII včetně působení hypoxického stresu (např. Dua *et al.* 1994). Výsledky mojí práce však těmto údajům neodpovídají. Z porovnání hodnot aktivit PSI a AHR můžeme usuzovat, že aktivita PSI se pod vlivem stresu zaplavením snižuje více než aktivita PSII. Tento pokles je markantnější po působení posthypoxického stresu. Z toho vyplývá, že nezávislá aktivita komplexu PSI je působením hypoxického stresu negativně více ovlivněna než nezávislá aktivita komplexu PSII.

### 5.3. Ultrastrukturní charakteristiky chloroplastů

Data používaná pro hodnocení ultrastrukturních charakteristik chloroplastů v buňkách mezofylu byla získána ze stereologického hodnocení přibližně mediálních řezů chloroplasty, kolmých na převládající rovinu tylakoidů. Působení hypoxického/posthypoxického stresu ovlivňuje nejen ultrastrukturu chloroplastů, ale i jejich tvar.

Poměr **délky řezu chloroplastem ku šířce řezu chloroplastem D/S** byl ve většině případů větší u stresovaných rostlin, než u rostlin kontrolních, s výjimkou genotypu 704 ve II. sérii, tj. chloroplasty stresovaných rostlin byly plošší. Tento rozdíl byl výraznější po působení posthypoxického stresu. Z toho lze usuzovat, že i na strukturní úrovni posthypoxický stres více ovlivňuje rostliny tomuto stresu vystavené, ve srovnání se stresem hypoxickým.

Statisticky významné rozdíly mezi stresovanými a kontrolními rostlinami byly zjištěny v relativním parciálním objemu (objemové hustotě) **plastoglobulů**. Plastoglobuly s největší pravděpodobností slouží k ukládání lipidických látek vzniklých odbouráváním tylakoidních membrán. To však zřejmě není jejich jediná funkce, viz Austin *et al.* (2006). Objemová hustota plastoglobulů byla průkazně vyšší u rostlin vystavených jak hypoxickému, tak posthypoxickému stresu proti kontrole, s výjimkou genotypu 2023 ve II. sérii po působení hypoxie – neprůkazný rozdíl a u genotypu 2023 ve II. sérii po působení posthypoxie – opačný rozdíl, tj. větší objemová hustota plastoglobulů u kontrolních rostlin. Ve většině případů byly zjištěné rozdíly vysoce statisticky průkazné. Tyto údaje odpovídají údajům objevujícím se v literatuře. Ladygin (1999, 2004) také pozoroval ve svých pokusech zvýšení počtu a rozměrů plastoglobulů. Hromadění plastoglobulů v chloroplastech je typickým průvodním jevem senescence listů, jak uvádí např. Kutík (1998) a také stresů, viz např. Mostowska (1997). U kukuřice byl zjištěn růst objemové hustoty plastoglobulů za chladového stresu (Kutík *et al.* 2004). V této mojí práci se výrazně lišila objemová hustota plastoglobulů u jednotlivých genotypů. Výrazně větší objemová hustota plastoglobulů byla pozorována u rostlin genotypu 704 ve všech případech, v některých případech statisticky průkazně.

Ve většině případů došlo ke zvýšení objemové hustoty **periferního retikula** u pokusných rostlin oproti rostlinám kontrolním, s výjimkou hypoxického stresu u genotypu 2023 v I. pokusné sérii a u genotypu 704 ve II. pokusné sérii. Téměř žádný z těchto rozdílů však nebyl statisticky průkazný. Periferní retikulum se uplatňuje zejména v transportních procesech mezi dimorfními chloroplasty u C<sub>4</sub> rostlin, mezi které patří i kukuřice.

Co se týká vlivu působení hypoxického/posthypoxického stresu na **tylakoidní systém** chloroplastů, je nutné konstatovat, že získané výsledky jsou nejednoznačné. Velký vliv na získaná data měla pokusná série, i přesto, že byla snaha tyto vlivy již při zakládání pokusů maximálně eliminovat. Hodnoty objemových hustot TG, TI i TC byly ve II. sérii výrazně vyšší než v první. Rozdíly mezi stresovanými a kontrolními rostlinami byly však v obou sériích statisticky neprůkazné. Výjimkou byla výrazně vyšší hustota TG a TC po působení posthypoxického stresu u genotypu 2023 ve II. sérii. Neprůkazné byly rovněž všechny zjištěné rozdíly v granalitě chloroplastů v obou sériích. Z těchto výsledků vyplývá, že působení jak hypoxického, tak posthypoxického stresu na tylakoidní soustavu chloroplastů nemá téměř žádný významný vliv.

K podobnému závěru došli i Wample a Davis (1983), ti popsali, že u slunečnice ovlivněné kořenovým hypoxickým stresem nedochází ke změně struktury chloroplastů ani mitochondrií v listech. Jedinou výjimkou je hromadění škrobu v mezofylových chloroplastech. Naopak Hurng a Kao (1993) popsali na rostlinách hrachu, rostliny velmi citlivé ke stresu zaplavením, již po čtyřdenním působení hypoxického stresu kořenů, dilataci tylakoidních membrán. Také Ladygin (1999, 2004) pozoroval za kořenové hypoxie u hrachu degradaci tylakoidních membrán. Tomuto ději připisoval hromadění plastoglobulů, jakožto míst, ve kterých dochází ke hromadění lipidních látek membrán po jejich degradaci. K degradaci membrán zřejmě dochází v důsledku porušení integrity membrány a následné zvýšené a nekontrolované propustnosti pro ionty. Dochází přitom k dilataci tylakoidů (Mostowska 1997). Narušení struktury tylakoidních membrán je do značné míry ovlivněno ROS, které při působení hypoxického stresu vznikají. Při působení posthypoxického stresu se tento efekt uplatňuje ještě silněji.



V literatuře je často popisován vznik výrazných škrobových inkluzí v chloroplastech při kořenové hypoxii. Wample a Davis (1983) pozorovali u zaplavených rostlin slunečnice výrazné zvýšení počtu a velikosti škrobových inkluzí a potvrdili hromadění škrobu i analyticky. K tomuto jevu pravděpodobně dochází v důsledku narušení (poklesu) transportu metabolitů floemem. Podle těchto autorů může nadměrné hromadění škrobu způsobit i předčasnou chlorózu listů, která je obecnou reakcí rostlin na stresové podmínky. Také Daugherty *et al.* (1994) zaznamenali u *Brassica rapa* objevení se velkých škrobových zrn v chloroplastech již po čtyřech dnech zaplavení. Podle nich mohou tato zrna u citlivějších rostlin výrazně porušit grana chloroplastů. I Ladygin (2004) pozoroval ve svých pokusech s rostlinami hrachu zvýšenou produkci škrobu. Naopak Hurng a Kao (1993) pozorovali u rostlin tabáku, při zaplavení kořenů, pokles množství škrobu asi o 2/3 oproti rostlinám kontrolním, již po čtyřech dnech působení stresu. Tento pokles byl spojen se zvýšením aktivity  $\alpha$ -amylázy. V mé práci nebylo žádné hromadění škrobu pozorováno, tj. chloroplasty v buňkách mezofylu neobsahovaly škrobové inkluze, což je u kukuřice,  $C_4$  rostliny NADP malátového typu, běžné. Škrobové inkluze v chloroplastech BSC byly u stresovaných rostlin většinou větší a vyskytovaly se ve větším počtu, než u rostlin kontrolních. Kvantitativně však ultrastruktura BSC chloroplastů v mé práci hodnocena nebyla a to zejména z časových důvodů.

#### 5.4. Závěr diskuze

Ve své práci jsem kvantitativně (stereologicky) hodnotila ultrastrukturu chloroplastů stresovaných a kontrolních rostlin. Pokusila jsem se tedy kvalifikovaně odhadovat objemové hustoty (relativní parciální objemy) jednotlivých komponent chloroplastů. Tato měření probíhala na ultratenkých řezech pomocí pravidelných bodových rastrů, jak navrhli pro světelnou mikroskopii Gundersen a Jensen (1987) a pro elektronmikroskopické studium ultrastruktury chloroplastů použili např. Kutík *et al.* (2004). Velmi pracné stereologické hodnocení bylo provedeno u MC chloroplastů, které mají u kukuřice systém tylakoidů diferencovaný na tylakoidy granální a tylakoidy intergranální. Zde se daly očekávat zajímavější ultrastrukturní změny pod vlivem hypoxického a posthypoxického stresu než u BSC chloroplastů. Suspenze

chloroplastů, v nichž byly měřeny fotochemické aktivity, byly také obohaceny o MC chloroplasty.

Problémem všech stereologických hodnocení ultrastruktury buněk je kvůli jejich pracnosti rozsah hodnoceného materiálu. Čtyři hodnocené rostliny (listy) a 20 hodnocených chloroplastů u každé varianty se osvědčily jako vhodné u podobného materiálu (Kutík *et al.* 2004).

Obtížně řešitelný problém vznikl při hodnocení posthypoxického stresu. Pro měření fotochemických charakteristik a obsahu fotosyntetických barviv v listech je potřeba velké množství rostlinného materiálu. Při hodnocení hypoxického stresu byl pro uvedená měření i pro hodnocení ultrastruktury chloroplastů brán u obou variant u obou genotypů dospělý, 4. list. Při hodnocení posthypoxického stresu, o dvacet dní později, bylo třeba pro tato měření brát další dospělý, 5. list, zatímco pro hodnocení ultrastruktury chloroplastů bylo možné brát 4. list (z omezeného počtu rostlin), který už ale začínal stárnout. Toto je třeba brát v úvahu při srovnávání funkčních a ultrastrukturních charakteristik chloroplastů.

Rozdíly mezi I. a II. pokusnou sérií, které jsou patrné zejména v ultrastruktuře chloroplastů, ale také v AHR (PL/S) nebo v poměru chl *a/b*, zřejmě souvisejí s časovým posunem mezi sériemi a z toho plynoucími změnami v délce slunečního svitu, ale také v aktuálním průběhu počasí (oblačnost, teploty). Zde se jako nevýhoda mých pokusů ukázala nemožnost pěstovat tak rozsáhlý materiál v přesně kontrolovatelných podmínkách.

Ve srovnání s hodnocením vlivu jiného abiotického stresu (chladový stres, Kutík *et al.* 2004) na tomtéž materiálu se ukázalo, že působení stresu zaplavení kořenů kukuřice na fotosyntetický aparát je poněkud jiné a méně výrazné, zejména pokud jde o ultrastrukturu chloroplastů. Po působení chladového stresu dochází především k redukci granálních i intergranálních tylakoidů, ale také k hromadění plastoglobulů a nárůstu periferního retikula. Stres zde ovšem působí přímo na fotosyntetický aparát, nikoli zprostředkovaně přes metabolické a signální dráhy, jako je tomu u stresu vyvolaného zaplavením kořenového systému.

Srovnáme-li působení hypoxického a posthypoxického stresu při zaplavení kořenů kukuřice na její fotosyntetický aparát, lze říci, že posthypoxický stres většinou ovlivňuje rostliny výrazněji. Jak uvádím v úvodní části diskuze, zřejmě žádný z autorů, kteří se zabývali vlivem zaplavení kořenů na chloroplasty, působení posthypoxického stresu nesledoval, a proto nemám s čím porovnat své údaje.

Srovnání citlivosti obou studovaných genotypů kukuřice ke stresu zaplavením kořenů je obtížné vzhledem k nejednoznačným výsledkům, které jsem získala. Různé charakteristiky fotosyntetického aparátu reagovaly na kořenovou hypoxii a posthypoxii různě. Na základě rozdílů v ultrastruktuře chloroplastů lze říci, že lépe rostoucí genotyp 2023 byl i poněkud odolnější ke stresu zaplavením.

Za hlavní přínos své práce považuji zhodnocení vlivu hypoxického i posthypoxického stresu kořenového systému na funkční a ultrastrukturní charakteristiky fotosyntetického aparátu. Nejen funkční, ale i ultrastrukturní charakteristiky byly hodnoceny kvantitativně. Takto komplexní pojetí se dosud, pokud je mi známo, v žádné práci neobjevilo.

## 6. SOUHRN

Cílem této diplomové práce bylo posoudit vliv hypoxického a posthypoxického stresu na fotosyntetický aparát. U pokusných rostlin, kukuřice seté (*Zea mays* L.) dvou genotypů, lépe rostoucího 2023 a hůře rostoucího CE704, byl zaplaven kořenový systém. Vzorky listové čepele byly odebírány z plně vyvinutých (již nerostoucích) listů. Sledovány byly morfologické a fyziologické charakteristiky rostlin, fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů, AHR a aktivita PSI, a zejména ultrastruktura chloroplastů v buňkách mezofylu. Rostliny byly hodnoceny na konci devítidenního hypoxického stresu a po dalších dvaceti dnech pěstování v optimálních růstových podmínkách – posthypoxický stres. Pokus byl proveden ve dvou opakováních.

Ukázalo se, že reakce rostlin kukuřice na stres zaplavení závisí do značné míry také na jejich genotypu i na pokusné sérii. Zajímal mne především vliv různého způsobu pěstování – stres a poststresová reakce oproti kontrole. Bylo zjištěno, že při hypoxickém i posthypoxickém stresu klesl ve srovnání s kontrolou, většinou průkazně, obsah chlorofylů i karotenoidů v listech a poměr chlorofylu ke karotenoidům byl vždy nižší než u kontroly. Dále se ukázalo, že AHR při přepočtu na plochu listu nebo na suchou hmotnost se mezi stresovanými a kontrolními rostlinami nikde průkazně nelišila, ale při přepočtu na množství chlorofylu byla u stresovaných rostlin vždy vyšší, většinou průkazně. Z toho by se dalo vyvozovat, že fotosystém II, uskutečňující Hillovu reakci, je za stresu výkonnější. V aktivitě fotosystému I nebyly mezi rostlinami stresovanými a kontrolními průkazné rozdíly většinou nalezeny.

Průkazné rozdíly zpravidla nebyly zjištěny ani ve specifické hmotnosti listů a jejich relativním obsahu vody.

Pokud jde o ultrastrukturu chloroplastů, ve druhé pokusné sérii byla zjištěna nápadně vyšší objemová hustota (relativní parciální objem ve chloroplastu) tylakoidů v granech i tylakoidů intergranálních než v první sérii. Vliv hypoxického i posthypoxického stresu na tylakoidy, s nimiž jsou spojeny fotochemické reakce fotosyntézy, však byl v obou sériích většinou neprůkazný. Pouze u genotypu 2023 ve druhé pokusné sérii bylo tylakoidů průkazně více za posthypoxického stresu než u kontroly. Plastoglobuly jsou kompartmentem chloroplastů, kde se hromadí zejména nevyužité lipoidní látky z tylakoidních membrán. U genotypu CE704 byla zjištěna

v obou sériích průkazně vyšší objemová hustota tohoto kompartmentu za stresových podmínek ve srovnání s kontrolou, výrazněji za posthypoxie než za hypoxie – zřejmě se zde sčítá stres a stárnutí listů. U genotypu 2023 byla stejná situace v první pokusné sérii, ale ve druhé sérii byl za hypoxie rozdíl neprůkazný, za posthypoxie průkazný, ale v opačném smyslu (více plastoglobulů u kontroly). Podmínky pěstování ovlivňovaly s různou průkazností také tvar chloroplastů v buňkách mezofylu, za stresu byly chloroplasty spíše více zploštělé než u kontroly.

Lze shrnout, že zaplavení kořenového systému působí na fotosyntetický aparát kukuřice, ale slaběji a méně jednoznačně, než jsem očekávala. Nejvýraznější vliv má tento stres na obsah fotosyntetických barviv v listech, na aktivitu fotosystémů a ultrastrukturu chloroplastů působí méně.

## **7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY**

**Albrecht, G., Wiedenroth, E.M.:** Protection against activated oxygen following reaeration of hypoxically pretreated wheat roots. The response of the glutathione system. - *J. exp. Bot.* 45: 449-455, 1994.

**Alscher-Herman, R., Jagendorf, A.T., Grumet, R.:** Ribosome-thylakoid association in peas. - *Plant Physiol.* 64: 232-235, 1979.

**Ahmed, S., Nawata, E., Hosohawa-Domae, Y., Sakuratani, T.:** Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. - *Plant Sci.* 163: 117-123, 2002.

**Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F., Staehelin, L.A.:** Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. - *Plant Cell* 18: 1693-1703, 2006.

**Bartoš, J., Berková, E., Šetlík, I.:** A versatile chamber for gas exchange measurements in suspensions of algae and chloroplasts. - *Photosynthetica* 9: 395 - 406, 1975.

**Beamelt, S., Keetman, U., Albrecht, G.:** Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defence system in roots of wheat seedlings. - *Plant Physiol.* 116: 651-658, 1998.

**Biswal, B., Biswal, U.C.:** Photosynthesis under stress: stress signals and adaptive response of chloroplasts. - In: Pessaraki, M. (ed.): *Handbook of Plant and Crop Stress*. 2<sup>nd</sup> Ed. Pp. 315-336. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 1999.

**Biswal, U.C., Biswal, B., Raval, M.K.:** Chloroplast Biogenesis. From Proplastid to Gerontoplast. - Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London 2003.

**Bláha, L., Hnilička, F., Zieglerová, J.:** Stres a stresor v rostlinné říši. - In: Bláha, L., Hnilička, F. (ed.): *Rostlina a stres*. Pp. 5-9. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 2003.

**Bragina, T.V., Ponomareva, Yu.V., Drozdova I.S., Grinieva, G.M.:** Photosynthesis and dark respiration in leaves of different ages of partly flooded maize seedlings. - *Russ. J. Plant Physiol.* 51: 342-347, 2004.

**Crawford, R.M.M.:** Plant survival without oxygen. - *Biologist* 40: 110-114, 1993.

**Crawford, R.M.M., Braendle, R.:** Oxygen deprivation stress in a changing environment. - *J. exp. Bot.* 47: 145-149, 1996.

**Čiamporová, M., Mistrík, I.:** Rastlinná bunka v nepriaznivých podmienkach. - Veda, Bratislava 1991.

**Daugherty, C.J., Matthews, S.W., Musgrave, M.E.:** Structural changes in rapid – cycling *Brassica rapa* selected for differential waterlogging tolerance. - *Can. J. Bot.* 72: 1322-1328, 1994.

**Dua, A., Talwar, G., Singal, H.R., Singh, R.:** CO<sub>2</sub> exchange, primary photochemical reactions and enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in *Brassica* pods during water stress and recovery. – *Photosynthetica* 30: 261-268, 1994.

**Evert, R.F., Russin, W.A., Bosabalidis, A.M.:** Anatomical and ultrastructural changes associated with sink-to-source transition in developing maize leaves. – *Int. J. Plant Sci.* 157: 247-261, 1996.

**Grineva, G.M.:** Reguljatsiya metabolizma u rastenii pri nedostatke kisloroda. [Regulation of Metabolism in Plants upon Oxygen Deficiency]. - Nauka, Moscow 1975. (cit. podle Ladygin a Semenova 1999)

**Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B.:** The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. - *J. Microsc.* 147: 229-263, 1987.

**Holá, D.:** Geneticky podmíněné rozdíly v obsahu a aktivitě některých složek thylakoidních membrán u inbrední kukuřice (*Zea mays* L.). Doktorská práce, PšF UK, Praha, 1999.

**Hnilička, F., Hniličková, H., Bláha, L.:** Působení vnějších negativních faktorů na rostliny, abiotické stresory. – In: Bláha, L., Hnilička, F. (ed.): Rostlina a stres. Pp. 9-34. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 2003.

**Hudák, J.:** Photosynthetic apparatus. - In: Pessaraki M. (ed.): Handbook of Photosynthesis. Pp. 27-48. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1997.

**Hudák, J., Herich, R., Bobák, M.:** Plastidy. - Veda, Bratislava 1983.

**Hurng, W.P., Kao, C.H.:** Loss of starch and increase of  $\alpha$  – amylase activity in leaves of flooded tobacco plants. - *Plant Cell Physiol.* - 34: 531-534, 1993.

**Jackson, M.B., Drew, M.:** Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. – In: Kozłowski, T. T. (ed.): Flooding and Plant Growth. Pp. 47-128. Academic Press, Orlando 1984.

**Justin, S.H.F.W., Armstrong, W.:** The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. - *New Phytol.* 106: 465-495, 1987.

**Knacker, T., Ruzicka, J., Schaub, H.:** Effect of oxygen concentration on the structure and function of chloroplasts of the C<sub>4</sub> – plant *Amaranthus paniculatus* L. – *Photosynthetica* 18: 502-511, 1984.

**Končalová, H., Pazourek, J.:** Root dimorphism in flooded *Carex gracilis* Curt. - *Acta Univ. Carol. Biol.* 31: 43-50, 1988.

**Kubínová, L.:** Recent stereological methods for the measurements of leaf anatomical characteristics: estimation of volume density, volume and surface area. - J. exp. Bot. 44: 165-173, 1993.

**Kutík, J.:** Chloroplast development. – In: Šesták, Z. (ed.): Photosynthesis during Leaf Development. Pp. 51-75. Academia, Praha 1985. Dr W. Junk Publ., Dordrecht – Boston- Lancaster 1985.

**Kutík, J.:** The development of chloroplast structure during leaf ontogeny. – Photosynthetica 35: 481-505, 1998.

**Kutík, J., Beneš, K.:** Chloroplasty – fotosyntetizující organely rostlinných buněk. - Biol. Listy 56: 292-318, 1991.

**Kutík, J., Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Haisel, D., Wilhelmová, N., Tichá, I.:** Ultrastructure and dimensions of chloroplasts in leaves of three maize (*Zea mays* L.) inbred lines and their F<sub>1</sub> hybrids grown under moderate chilling stress. - Photosynthetica 42: 447 – 455, 2004.

**Ladygin, V.G.:** [Functional activity and chloroplast structure in leaves of *Pisum sativum* and *Glycine max* under conditions of root hypoxia and anoxia.] – Fiziol. Rast. 46: 246-258, 1999. [In Russ.]

**Ladygin, V.G.:** The effect of root hypoxia and iron deficiency on the photosynthesis, biochemical composition, and structure of pea chloroplasts.- Russ. J. Plant Physiol. 51: 28-40, 2004.

**Ladygin, V.G., Semenova, G.A.:** Functional activity and the structure of chloroplasts in pea leaves under root hypoxia and anoxia. - Biology Bulletin 26: 123-133, 1999.

**Larcher, W.:** Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Fourth Edition. - Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2003.

**Lawlor, D.W.:** Photosynthesis. Third Edition.- BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford 2001.

**McKersie, B.D., Leshem, Y.Y.:** Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. - Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1994.

**Minchin, F.R., Pate, J.S.:** Effects of water, aeration and salt regime on nitrogen fixation in a nodulated legume - definition of an optimum root environment. - J. exp. Bot. 26: 60-69, 1975.

**Mostowska, A.:** Environmental factors affecting chloroplasts. – In: Pessaraki, M. (ed.): Handbook of Photosynthesis. Pp. 407-426. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1997.

**Nátr, L.:** Fotosyntéza. – In: Procházka, S. *et al.*: Fyziologie rostlin. Pp. 124-173. Academia, Praha 1998.



**Nilsen, E.T., Orcutt, D.M.:** The Physiology of Plants under Stress. - John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Weinheim 1996.

**Pechová, R., Kutík, J., Holá, D., Kočová, M., Haisel, D., Vičánková, A.:** The ultrastructure of chloroplasts, content of photosynthetic pigments, and photochemical activity of maize (*Zea mays* L.) as influenced by different concentrations of the herbicide amitrole. – *Photosynthetica* 41: 127-136, 2003.

**Pezeshki, S.R.:** Plant Response to Flooding. – In: Wilkinson, R.E. (ed): Plant-Environment Interactions. The University of Georgia, Griffin (Georgia) 1994.

**Ponnamperuma, F.N.:** Effects of flooding on soils. – In: Kozłowski, T. T. (ed.): Flooding and Plant Growth. Pp. 10-45, Academic Press, Inc., Orlando 1984.

**Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E.:** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. - *Biochim. biophys. Acta* 975: 384-394, 1989.

**Pradet, A., Bomsel, J.L.:** Energy metabolism in plant under hypoxia and anoxia. - In: Hook, D. D. and Crawford, R. M. M. (ed.): Plant Life in Anaerobic Environments. Pp. 89-118. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor (Michigan) 1978.

**Rascio, N., De Bellis, L., Alpi, A.:** Cell ultrastructure and some enzyme activities in rice coleoptiles grown in air and in anoxia. - *Physiol. Plant.* 70: 223-227, 1987.

**Reynolds, E.S.:** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. - *J. Cell Biol.* 17: 208-212, 1963.

**Sachs, M.M., Freeling, M., Okamoto, R.:** The anaerobic proteins of maize. - *Cell* 20: 761-767, 1980.

**Spurr, A.R.:** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. - *J. ultrastruct. Res.* 26: 31-43, 1969.

**Subbaiah, C.C., Sachs, M.M.:** Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. - *Ann. Bot.* 90: 119 – 127, 2003.

**Šesták, Z.:** Photosynthesis during Leaf Development. – Academia, Praha 1985. Dr W. Junk Publ., Dordrecht – Boston – Lancaster 1985.

**Thomson, W.W., Whatley, J.M.:** Development of nongreen plastids. – *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 375-394, 1980.

**VanToai, T.T., Bolles, C.S.:** Postanoxic injury in soyabean (*Glycine max*) seedlings. - *Plant Physiol.* 97: 588-592, 1991.

**Vartapetian, B.B., Andreeva, I.N., Kozlova, G.I.:** The resistance to anoxia and the mitochondrial fine structure of rice seedlings. - *Protoplasma* 88: 215-224, 1976.

**Vodrážka, Z.:** Fyzikální chemie pro biologické vědy. - Academia, Praha 1982.

**Votrubová, O.:** Anatomie rostlin. - Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 1996.

**Votrubová, O., Kadeřábek, J., Albrechtová, J.:** Distribution of stomata on the second leaf of *Zea mays* following root hypoxia. - *Biol. Plant.* 34: 115-119, 1992.

**Wample, R.L., Davis, R.W.:** Effect of flooding on starch accumulation in chloroplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). - *Plant Physiol.* 73: 195-198, 1983.

**Wilkinson, R.E.:** Plant – Environment Interactions. – Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1994.

**Wise, R.R., Hooper, J.K.:** The Structure and Function of Plastids. - *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Volume 23. Springer, Dordrecht 2006.

**Wroblewska, B., Mostowska, A., Poskuta, J.:** The effect of oxygen concentration on chloroplast development, chlorophyll synthesis and starch accumulation in etiolated bean seedlings upon illumination. - *Environ. exp. Bot.* 34: 153-163, 1994.

## **8. Přílohy**

V přílohách jsou uvedeny číselné hodnoty naměřených ultrastrukturních charakteristik chloroplastů a jejich střední chyby průměru – objemové hustoty ultrastrukturních součástí chloroplastů a podíl délky řezu chloroplastem ku šířce řezu chloroplastem (tabulka 33. a 34.). U chloroplastů mezofylových buněk byla měřena objemová hustota granálních a intergranálních tylakoidů, periferního retikula, škrobových inkluzí a plastoglobulů, objemová hustota stromatu byla určena jako zbývající procenta do 100%. Granálnost byla vypočítána jako podíl objemové hustoty granálních tylakoidů a objemové hustoty všech tylakoidů.

V tabulkách 35. a 36. jsou uvedeny číselné hodnoty naměřených fotosyntetických charakteristik listů a jejich střední chyby průměru. Byla měřena aktivita Hillovy reakce, aktivita fotosystému I, obsah chlorofylu *a*, obsah chlorofylu *b* a obsah celkových karotenoidů. Naměřené charakteristiky byly vztaženy na jednotku listové plochy, jednotku hmotnosti sušiny listu a jednotkové množství chlorofylu. Dále je zde uvedena specifická hmotnost listu a relativní obsah vody v listu a jejich střední chyby průměru.

Tab. 33. Objemové hustoty ultrastrukturálních součástí chloroplastů a poměr délky a šířky řezu chloroplastem u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023), obou způsobů pěstování (hypoxie A, posthypoxie B, kontrolní rostliny K) v sérii I. Uvedena je ± střední chyba průměru. Použité zkratky znamenají : TG – tylakoidy granální [%], TI - tylakoidy intergranální [%], TC – tylakoidy celkové [%], TC – tylakoidy celkové [%], G – granalita [%], PG – plastoglobuly [%], PR – periferní retikulum [%], S – stroma [%], D/S – délka řezu chloroplastem/šířka řezu chloroplastem.

série I	TG	TI	TC	G	PG	PR	S	D/S
IAV 704	29,93 ± 1,38	15,14 ± 0,63	45,07 ± 1,47	66,01 ± 1,54	2,87 ± 0,29	1,74 ± 0,21	49,31 ± 1,55	2,63 ± 0,11
IAK 704	31,49 ± 1,08	15,90 ± 0,99	47,39 ± 1,48	66,64 ± 1,55	1,36 ± 0,24	1,53 ± 0,17	49,71 ± 1,36	2,44 ± 0,09
IBV 704	31,89 ± 1,74	16,24 ± 1,05	48,12 ± 2,25	66,15 ± 1,79	7,05 ± 0,74	2,19 ± 0,30	42,63 ± 1,98	3,08 ± 0,14
IBK 704	34,63 ± 1,75	16,50 ± 0,64	51,14 ± 1,82	67,17 ± 1,46	2,79 ± 0,31	1,84 ± 0,25	44,24 ± 1,85	2,38 ± 0,10
IAV 2023	26,66 ± 1,10	17,09 ± 0,99	43,75 ± 1,33	61,01 ± 1,83	2,64 ± 0,23	1,27 ± 0,25	52,52 ± 1,29	2,38 ± 0,09
IAK 2023	29,69 ± 1,28	16,30 ± 0,75	45,99 ± 1,76	64,49 ± 1,07	1,26 ± 0,20	1,36 ± 0,19	51,39 ± 1,64	2,21 ± 0,08
IBV 2023	25,37 ± 1,73	16,43 ± 1,10	41,79 ± 2,36	60,40 ± 1,75	4,02 ± 0,61	2,35 ± 0,31	51,84 ± 2,14	3,15 ± 0,19
IBK 2023	27,83 ± 1,47	15,96 ± 0,86	43,80 ± 1,73	63,19 ± 1,81	2,40 ± 0,37	1,49 ± 0,17	52,31 ± 1,62	2,33 ± 0,10

Tab. 34. Objemové hustoty ultrastrukturálních součástí chloroplastů a poměr délky a šířky řezu chloroplastem u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023), obou způsobů pěstování (hypoxie A, posthypoxie B, kontrolní rostliny K) v sérii II. Uvedena je ± střední chyba průměru. Použité zkratky znamenají : TG – tylakoidy granální [%], TI - tylakoidy intergranální [%], TC – tylakoidy celkové [%], G – granalita [%], PG – plastoglobuly [%], PR – periferní retikulum [%], S – stroma [%], D/S – délka řezu chloroplastem/šířka řezu chloroplastem.

série II	TG	TI	TC	G	PG	PR	S	D/S
IIAV 704	36,59 ± 1,94	25,10 ± 1,59	61,69 ± 2,76	59,38 ± 1,80	3,33 ± 0,29	2,70 ± 0,25	33,82 ± 2,83	2,27 ± 0,12
IIAK 704	37,33 ± 1,43	23,64 ± 1,09	60,97 ± 1,65	61,18 ± 1,57	2,34 ± 0,23	3,00 ± 0,22	33,70 ± 1,62	2,66 ± 0,08
IIBV 704	37,41 ± 1,69	24,53 ± 1,29	61,93 ± 2,37	60,34 ± 1,53	7,27 ± 0,75	3,36 ± 0,21	27,43 ± 2,31	2,46 ± 0,16
IIBK 704	38,44 ± 1,37	28,68 ± 2,23	67,12 ± 1,94	57,98 ± 2,39	3,70 ± 0,44	2,65 ± 0,26	26,53 ± 1,90	2,60 ± 0,10
IIAV 2023	36,48 ± 1,50	24,95 ± 1,24	61,44 ± 1,38	59,28 ± 1,93	2,22 ± 0,23	3,30 ± 0,25	32,85 ± 1,29	2,69 ± 0,11
IIAK 2023	36,24 ± 1,51	25,06 ± 1,37	61,29 ± 1,93	59,16 ± 1,65	1,77 ± 0,27	2,64 ± 0,25	34,29 ± 1,92	2,48 ± 0,11
IIBV 2023	42,75 ± 1,83	28,10 ± 1,26	70,85 ± 1,99	60,17 ± 1,67	2,28 ± 0,32	3,17 ± 0,24	23,71 ± 1,81	3,39 ± 0,16
IIBK 2023	37,95 ± 1,33	25,59 ± 1,43	63,54 ± 2,02	59,97 ± 1,54	3,38 ± 0,42	2,64 ± 0,23	30,44 ± 1,82	2,23 ± 0,08

Tab. 35. Funkční fotosyntetické charakteristiky listů, specifická hmotnost listu a relativní obsah vody v listu u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023), obou způsobů pěstování (hypoxie A, posthypoxie B, kontrolní rostliny K) v sérii I. Uvedena je ± střední chyba průměru. Použité zkratky znamenají : AHR - aktivita Hillovy reakce, PSI - aktivita fotosystému I, chl a – obsah chlorofylu a, chl b - obsah chlorofylu b, kar – obsah celkových karotenoidů, SpHm – specifická hmotnost listu, RWC - relativní obsah vody v listu, (LP) vztaženo na jednotku listové plochy, (S) - vztaženo na jednotku hmotnosti sušiny listu, (chl) - vztaženo na jednotkové množství chlorofylu. Viz grafy 6. – 18.

	IAV 704	IAK 704	IBV 704	IBK 704	IAV 2023	IAK 2023	IBV 2023	IBK 2023
AHR (LP)	4,02 ± 0,42	4,04 ± 0,33	3,05 ± 0,33	3,72 ± 0,27	4,94 ± 0,34	4,70 ± 0,73	3,60 ± 0,32	4,25 ± 0,25
AHR (S)	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,01
AHR (chl)	17,02 ± 1,80	12,50 ± 0,87	16,57 ± 1,07	12,46 ± 0,96	18,97 ± 1,69	14,25 ± 2,03	18,91 ± 1,64	14,25 ± 0,89
PSI (LP)	10,03 ± 0,48	12,81 ± 0,74	6,52 ± 0,63	11,01 ± 0,52	11,98 ± 0,55	14,11 ± 0,69	7,28 ± 0,44	11,44 ± 0,74
PSI (S)	0,64 ± 0,05	0,79 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,65 ± 0,06	0,74 ± 0,05	0,81 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,60 ± 0,06
PSI (chl)	42,41 ± 1,65	39,61 ± 1,77	35,17 ± 1,09	36,81 ± 1,44	45,65 ± 1,37	43,12 ± 1,31	38,17 ± 1,27	38,17 ± 1,16
chl a (LP)	18,34 ± 0,36	25,12 ± 0,77	14,53 ± 1,68	23,06 ± 1,18	20,48 ± 0,59	25,51 ± 0,83	14,95 ± 1,13	23,26 ± 1,53
chl a (S)	11,63 ± 0,63	15,49 ± 0,28	8,42 ± 1,12	13,59 ± 1,13	12,66 ± 0,66	14,73 ± 0,62	7,47 ± 0,76	12,19 ± 1,05
chl b (LP)	5,29 ± 0,09	7,19 ± 0,21	4,14 ± 0,49	6,91 ± 0,29	5,73 ± 0,11	7,20 ± 0,18	4,22 ± 0,40	6,78 ± 0,43
chl b (S)	3,35 ± 0,16	4,44 ± 0,14	2,40 ± 0,32	4,07 ± 0,30	3,54 ± 0,14	4,15 ± 0,14	2,11 ± 0,26	3,56 ± 0,33
chl (LP)	23,63 ± 0,41	32,31 ± 0,94	18,67 ± 2,17	29,97 ± 1,46	26,21 ± 0,68	32,70 ± 0,98	19,17 ± 1,52	30,04 ± 1,96
chl (S)	14,99 ± 0,78	19,94 ± 0,39	10,82 ± 1,44	17,66 ± 1,43	16,20 ± 0,80	18,88 ± 0,75	9,58 ± 1,02	15,75 ± 1,37
kar (LP)	3,80 ± 0,10	4,33 ± 0,18	3,07 ± 0,17	4,13 ± 0,17	3,95 ± 0,12	4,42 ± 0,07	2,99 ± 0,11	4,12 ± 0,21
kar (S)	2,40 ± 0,09	2,67 ± 0,06	1,77 ± 0,13	2,43 ± 0,15	2,44 ± 0,13	2,55 ± 0,07	1,49 ± 0,07	2,15 ± 0,14
chl a/b	3,47 ± 0,06	3,49 ± 0,08	3,51 ± 0,03	3,33 ± 0,05	3,57 ± 0,06	3,54 ± 0,07	3,56 ± 0,08	3,43 ± 0,05
chl/kar	6,23 ± 0,20	7,47 ± 0,16	6,03 ± 0,43	7,25 ± 0,14	6,65 ± 0,05	7,39 ± 0,10	6,40 ± 0,42	7,28 ± 0,15
SpHm	15,85 ± 0,56	16,21 ± 0,35	17,50 ± 0,95	17,16 ± 0,91	16,24 ± 0,46	17,34 ± 0,19	20,22 ± 0,85	19,21 ± 0,95
RWC	97,40 ± 0,80	97,24 ± 0,75	96,94 ± 0,60	95,98 ± 0,45	95,56 ± 1,19	96,42 ± 0,56	95,78 ± 0,53	90,59 ± 3,60

Tab. 36. Funkční fotosyntetické charakteristiky listů, specifická hmotnost listu a relativní obsah vody v listu u obou genotypů (genotyp 704, genotyp 2023), obou způsobů pěstování (hypoxie A, posthypoxie B, kontrolní rostliny K) v sérii II. Uvedena je ± střední chyba průměru. Použité zkratky znamenají: AHR - aktivita Hillovy reakce, PSI - aktivita fotosystému I, chl a – obsah chlorofylu a, chl b - obsah chlorofylu b, kar – obsah celkových karotenoidů, SpHm – specifická hmotnost listu, RWC - relativní obsah vody v listu, (LP) vztaženo na jednotku listové plochy, (S) - vztaženo na jednotku hmotnosti sušiny listu, (chl) - vztaženo na jednotkové množství chlorofylu. Viz grafy 6. – 18.

	IIAV 704	IIAK 704	IIBV 704	IIBK 704	IIAV 2023	IIAK 2023	IIBV 2023	IIBK 2023
AHR (LP)	5,16 ± 0,34	4,03 ± 0,34	2,67 ± 0,27	3,38 ± 0,20	5,36 ± 0,18	5,08 ± 0,42	4,32 ± 0,24	4,73 ± 0,46
AHR (S)	0,35 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,02
AHR (chl)	19,42 ± 0,93	12,68 ± 0,71	13,24 ± 1,31	12,37 ± 0,83	18,98 ± 0,26	15,02 ± 1,06	20,98 ± 1,74	15,51 ± 1,28
PSI (LP)	11,28 ± 0,97	12,63 ± 0,80	7,35 ± 0,47	9,24 ± 0,56	12,09 ± 0,22	14,10 ± 0,08	8,45 ± 0,74	11,64 ± 0,73
PSI (S)	0,76 ± 0,09	0,78 ± 0,07	0,46 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,79 ± 0,03	0,83 ± 0,01	0,46 ± 0,05	0,65 ± 0,04
PSI (chl)	42,27 ± 2,42	39,85 ± 1,35	36,24 ± 1,54	33,74 ± 1,85	42,89 ± 0,65	41,84 ± 0,73	40,33 ± 1,62	38,09 ± 1,38
chl a (LP)	20,78 ± 0,75	24,72 ± 0,94	16,16 ± 1,62	21,40 ± 1,77	22,38 ± 0,57	26,58 ± 0,45	16,42 ± 1,22	23,58 ± 0,89
chl a (S)	14,01 ± 0,89	15,24 ± 1,01	10,08 ± 0,89	12,96 ± 1,03	14,60 ± 0,35	15,64 ± 0,35	8,92 ± 0,93	13,27 ± 0,68
chl b (LP)	5,79 ± 0,15	6,89 ± 0,11	4,35 ± 0,37	6,29 ± 0,61	5,84 ± 0,09	7,14 ± 0,03	4,47 ± 0,32	6,92 ± 0,22
chl b (S)	3,90 ± 0,20	4,24 ± 0,20	2,71 ± 0,16	3,80 ± 0,34	3,81 ± 0,09	4,20 ± 0,06	2,42 ± 0,24	3,89 ± 0,13
chl (LP)	26,57 ± 0,88	31,61 ± 1,05	20,51 ± 1,94	27,68 ± 2,35	28,22 ± 0,65	33,72 ± 0,46	20,88 ± 1,49	30,49 ± 1,06
chl (S)	17,91 ± 1,09	19,49 ± 1,20	12,79 ± 1,03	16,76 ± 1,35	18,42 ± 0,43	19,85 ± 0,39	11,34 ± 1,15	17,16 ± 0,80
kar (LP)	3,90 ± 0,12	4,17 ± 0,17	3,17 ± 0,15	3,82 ± 0,22	4,08 ± 0,09	4,40 ± 0,09	3,14 ± 0,17	3,98 ± 0,15
kar (S)	2,63 ± 0,15	2,57 ± 0,17	1,99 ± 0,11	2,31 ± 0,13	2,66 ± 0,04	2,59 ± 0,06	1,70 ± 0,15	2,24 ± 0,12
chl a/b	3,59 ± 0,07	3,58 ± 0,08	3,70 ± 0,20	3,42 ± 0,11	3,83 ± 0,05	3,72 ± 0,06	3,69 ± 0,19	3,41 ± 0,09
chl/kar	6,81 ± 0,08	7,60 ± 0,09	6,46 ± 0,46	7,24 ± 0,43	6,92 ± 0,05	7,67 ± 0,07	6,64 ± 0,20	7,67 ± 0,13
SpHm	14,92 ± 0,42	16,31 ± 0,51	15,99 ± 0,57	16,54 ± 0,73	15,34 ± 0,45	17,00 ± 0,28	18,61 ± 0,66	17,82 ± 0,45
RWC	98,42 ± 0,25	98,29 ± 0,40	95,78 ± 0,57	97,05 ± 0,15	96,69 ± 0,52	96,12 ± 0,65	95,09 ± 0,63	95,06 ± 1,07