

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vývoj průduchů u dvouděložných
rostlin: vliv faktorů prostředí**

Bakalářská práce

Tereza Kalistová

Školitel: Mgr. Jitka Neuwirthová

České Budějovice 2019

Kalistová, T., 2019: Vývoj průduchů u dvouděložných rostlin: vliv faktorů prostředí. [Stomatal development in dicotyledons: the effect of environmental factors. Bc. Thesis, in Czech] – 43 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Stoma are microscopic structure in plant epidermis consisted of two guard cells and a pore between them. Their development is influenced by internal processes and different environmental factors as light, water availability or concentration of CO₂. Carbon in CO₂ has two stable isotopes, ¹²C and ¹³C, which have different weight and concentration in atmosphere. The ¹³C abundance ($\delta^{13}\text{C}$) in leaf tissue reflects the environmental condition experienced during the leaf live span. Here I studied: i) development of epidermal cells (primarily of stomata) during first true leaf ontogeny in *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* and ii) effect of milling the dry leaf tissue in microtubes on $\delta^{13}\text{C}$.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou Univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Tcheses.cz, provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 16.4.2019

.....
Tereza Kalistová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat v první řadě své školitelce Mgr. Jitce Neuwirthové za vedení během mé práce, inspirativní připomínky, podporu, trpělivost, ochotu a pomoc. Dále bych chtěla poděkovat prof. Jiřímu Šantrůčkovi za přátelské přijetí, přínosné poznámky a pomoc, Mgr. Ladislavovi Markovi za provádění izotopových analýz, Ing. Petře Fialové za pomoc při pěstování a sázení rostlin, RNDr. Jiřímu Kubáskovi, Marii Hronkové Ph.D. a všem z kolektivu katedry experimentální biologie rostlin za přátelskou atmosféru a ochotu s čímkoli pomoc. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a občasné vítané rozptýlení.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	1
ÚVOD.....	2
1 EPIDERMIS.....	2
2 PRŮDUCHY.....	2
2.1 VÝVOJ PRŮDUCHŮ	3
2.2 GENY A MOLEKULÁRNÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝVOJ PRŮDUCHŮ.	5
2.3 FYTOHORMONY OVLIVŇUJÍCÍ VÝVOJ PRŮDUCHŮ	7
2.4 ENVIRONMENTÁLNÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝVOJ PRŮDUCHŮ	8
2.4.1 <i>Vliv záření.....</i>	8
2.4.2 <i>Dostupnost vody</i>	9
2.4.3 <i>Oxid uhličitý</i>	9
2.5 OKAMŽITÁ REAKCE NA ENVIRONMENTÁLNÍ PODMÍNKY	10
3 STABILNÍ IZOTOPY A JEJICH VYUŽITÍ PŘI VÝZKUMU FUNKCE PRŮDUCHŮ A LISTU 11	
3.1 APLIKACE ANALÝZY IZOTOPOVÉHO SLOŽENÍ	12
3.2 UHLÍK A IZOTOPOVÁ DISKRIMINACE V ROSTLINÁCH	13
CÍLE PRÁCE	14
PRAKTICKÁ ČÁST	14
4 MATERIÁL A METODY.....	14
4.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL	14
4.2 PRŮDUCHOVÁ HUSTOTA A PRŮDUCHOVÝ INDEX	16
4.3 PLOCHA LISTŮ.....	17
4.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO IZOTOPOVOU ANALÝZU	17
4.4.1 <i>Kontrola homogenity.....</i>	17
4.4.2 <i>Příprava vzorků pro izotopovou analýzu.....</i>	17
4.5 IZOTOPOVÉ ANALÝZY.....	19
4.6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	20
5 VÝSLEDKY	20
5.1 VLIV STÁRNUTÍ LISTU NA SD, SI A PLOCHU LISTU	20
5.2 IZOTOPOVÁ ANALÝZA	29
6 DISKUZE	32
6.1 VLIV STÁRNUTÍ LISTU NA SD, SI A PLOCHU LISTU	32
6.2 IZOTOPOVÁ ANALÝZA	34
ZÁVĚR.....	36
LITERATURA	38
PŘÍLOHY	43

Seznam použitých zkratk

Zkratka	Název	Jednotka
g_s	průduchová vodivost	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
C_i	koncentrace CO_2 uvnitř listu	$\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$
C_a	koncentrace CO_2 v atmosféře	$\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$
WUE	efektivita využití vody rostlinou	
SC	průduchové buňky	
USC	nedovyvinuté průduchové buňky	
PVC	dlaždicovité buňky	
MC	meristemoidy	
MMC	mateřské buňky meristemoidů	
GMC	mateřské buňky průduchů	
SD	průduchová hustota	mm^{-2}
SI	průduchový index	%
^{12}C , ^{13}C	stabilní izotopy uhlíku lišící se neutronovým číslem	
$\delta^{13}\text{C}$	izotopový poměr ^{13}C , množství ^{13}C vzhledem ke standardu	‰
f	frakce	%

Úvod

1 Epidermis

Epidermis je pokožka rostlin, která je většinou tvořena jednou vrstvou buněk a tvoří rozhraní mezi rostlinou a okolím (Glover, 2007). Z vnější strany kryje často pokožku nadzemních částí rostlin kutikula, která se u vyšších rostlin nachází především na listech, plodech a někdy i stoncích a chrání rostlinu před abiotickým (např. vysoká intenzita záření, nadměrný výpar vody) i biotickým stresem (např. patogeny).

U mladých listů je pokožka tvořena nediferencovanými protodermálními buňkami, které se dále diferencují na tři typy buněk, a to dlaždicovité buňky, průduchy a trichomy. (Larkin et al. 1997; Zoulias et al. 2018). V pokožce se dále mohou nacházet vodní skuliny, které vznikají přeměnou průduchů.

Dlaždicovité buňky tvoří základ pokožky. Trichomy jsou útvary, které mohou být jedno i mnoho buněčné. Vyčnívají z epidermis a chrání rostlinu před nadměrným zářením, teplotou či mechanickým poškozením.

2 Průduchy

Průduchy jsou mikroskopické útvary tvořené dvěma svěřacími buňkami, které ohraničují "mikroskopické otvory" neboli průduchové štěrbin. Rostlina je může flexibilně zavírat či otvírat v závislosti na podnětech z okolního prostředí a stavu rostliny. Skrz průduchy dochází k výměně plynů mezi rostlinou a atmosférou, jedná se především o oxid uhličitý, kyslík a vodu.

Jsou jednou z evolučních novinek, která byla potřebná pro výstup rostlin z vody na souš. Umožňují spolu s kutikulou, mezibuněčnými prostory a xylémem s floémem fungování rostlin v homoiohydričtém stavu (Edwards 1993). Tedy ve stavu, kdy rostliny udržují poměrně stabilní vodní prostředí uvnitř svého těla a nejsou tolik závislé na aktuálním množství vody v okolním prostředí. Fosilní nálezy ukazují, že průduchy se vyskytovaly u vyšších rostlin (*Embryophyta*) už před 400 miliony let (Edwards and Rose 1984; Raven 2002). Předpokládá se, že během evoluce vznikly pouze jednou. Vaten a Bergmann (2012) použili pro hledání jejich původu paleobotanické analýzy (porovnávající fosilní nálezy se současnými rostlinami) v kombinaci s fylogenetickými analýzami. Zaměřili se na bazální skupiny vyšších rostlin (*Embryophyta*), mezi které patří játrovky (*Marchantiophyta*), mechy

(*Bryophyta*) a hlevíky (*Anthocerotophyta*). Z těchto bazálních skupin jediné játrovky průduchy nemají. Výměna plynů u nich probíhá přes epidermální póry (epidermal air pore), jejichž vývoj i morfologie se liší od vývoje a morfologie průduchů. U mechů i hlevíků se průduchy nacházejí, což poukazuje na to, že se játrovky v evoluci pravděpodobně oddělily od ostatních vyšších rostlin ještě před vývojem průduchů a jsou tedy nejbazálnější skupinou vyšších rostlin. Zajímavé je, že regulace průduchů a morfologie svěřacích buněk průduchů je u mechů i hlevíků velice blízká vyšším rostlinám.

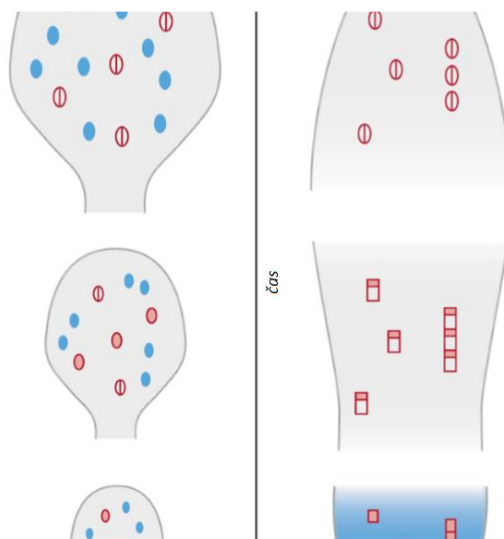
Příjem CO₂ je pro zelené rostliny důležitý, protože z něj během fotosyntézy tvoří organické látky nutné pro život rostliny. Každý rok projde skrz póry průduchů 40% atmosférického CO₂, ale jen 14% je asimilováno během procesu fotosyntézy (Ciais et al. 1997). Zároveň ale rostlina při otevřených průduších ztrácí vodu, která je leckdy pro rostlinu limitující. Proto se musí rostlina přizpůsobovat okolnímu prostředí a regulovat otevření průduchů a velikost průduchové štěrbin v závislosti na aktuální změně okolních faktorů jako například světelného záření, CO₂, teploty či dostupnosti vody (Schroeder et al. 2001). Rostlina reflektuje okolní podmínky i během vývoje nových listů regulací velikosti průduchů, jejich množstvím na plochu (hustota průduchů na jednotku plochy; *stomatal density* – SD) a průduchovým indexem (poměr mezi počtem průduchových buněk a všemi epidermálními buňkami tedy dlaždicovými i průduchovými dohromady; *stomatal index* – SI).

Základní uspořádání průduchů je pro jednotlivé orgány a druhy specifické. Z pohledu umístění průduchů na listu jsou rozlišovány tři typy. I) Amfistomatické listy s průduchy na svrchní (adaxiální) i na spodní (abaxiální) straně, mezi které patří například huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), řeřicha setá (*Lepidium sativum*) či jetel plazivý (*Trifolium repens*). II) Hypostomatické listy u nichž se průduchy nacházejí pouze na abaxiální straně patří mezi nejčastější. Příkladem jsou rostliny z rodu fikus (*Ficus*) a břečťan (*Hedera*). III) Epistomatické listy jsou nejméně časté, průduchy se u nich nachází pouze na adaxiální straně. Tento typ listu mají především vodní rostliny jejichž listy plavou na hladině jako například leknín bílý (*Nymphaea alba*) (Šantrůček 1998).

2.1 Vývoj průduchů

Průduchy se rozdílně vyvíjejí u dvouděložných a jednoděložných rostlin (Croxdale 2000; Sylvester et al. 1996). Zatímco u jednoděložných nalezneme dělicí se buňky na bázi listů

a průduchy vznikají v podélných liniích, u dvouděložných vznikají nepravidelně po celé ploše listu a dělicí se buňky se nalézají i v oblastech mezi dospělými průduchy (**Obr. 1**).



Obr. 1: Dělení buněk u dvouděložných rostlin (A, zde zastupuje *Arabidopsis*) probíhá po celé ploše listu. Dělicí se buňky, ze kterých posléze vzniknou průduchy, jsou zobrazeny červeně, dělicí se buňky, ze kterých průduchy nevzniknou jsou zobrazeny modře. “Modré“ buňky se mohou asymetricky rozdělit za vzniku “červených“ buněk, vedoucích ke vzniku průduchu a epidermálních buněk. U jednoděložných rostlin (B, zde *Tradescantia*) se buňky dělí na bázi listu a průduchy vznikají v podélných liniích (Croxdale 2000).

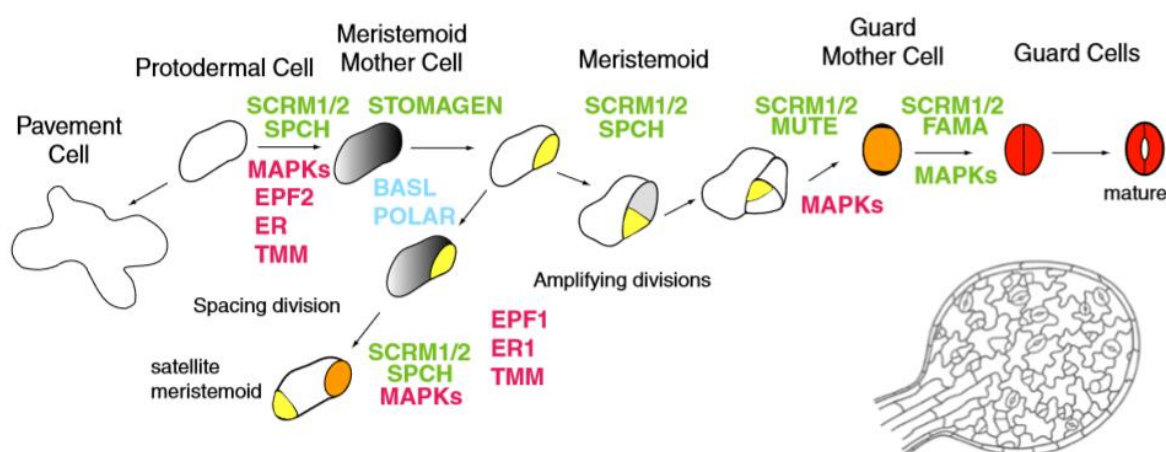
U jednoděložných rostlin vzniká mateřská buňka průduchu jen jedním asymetrickým dělením. Vzniknou dvě nestejně velké buňky, větší z nich je blíže bázi listu a menší, iniciální buňka, je blíže vrcholu listu. Z iniciální buňky posléze vznikají symetrickým dělením svěřací průduchové buňky (Larkin et al. 1997; Vaten and Bergmann 2012).

U dvouděložných rostlin se na začátku vývoje průduchu asymetricky rozdělí mateřská buňka meristemoidu (*meristemoid mother cell* – MMC) (Larkin et al. 1997). Asymetrickým dělením vznikne menší meristemoidní (*meristemoid* - M) a větší doplňková sesterská buňka meristemoidu. Ze sesterské buňky mohou vzniknout dvě dlaždicovité buňky (*pavement cells* – PVC). Meristemoidní buňka, která je obvykle trojúhelníkového tvaru, se může dále asymetricky dělit za vzniku nové meristemoidní buňky a jí odpovídající sesterské buňky nebo se dále diferencovat za vzniku oválné mateřské buňky průduchu (*guard mother cell* – GMC). Mateřská buňka průduchu se symetricky dělí za vzniku svěřacích průduchových buněk, mezi kterými vzniká průduchová štěrbina (**Obr. 2**) (Geisler and Sack 2002).

Buňky se dělí podle “pravidla vmezeřené buňky“ (One-cell spacing rule). Při opakovaném dělení buněk v okolí průduchu je dělení vždy orientované tak, aby nová meristemoidní buňka vznikla od průduchu či meristemoidní buňky odděleně. Tak jsou vždy odděleny alespoň jednou dlaždicovitou buňkou (Larkin et al. 1997).

2.2 Geny a molekulární faktory ovlivňující vývoj průduchů.

Jak již bylo zmíněno průduchy se vyvíjí postupně tak, že mateřská buňka meristemoidu (MMC) se rozdělí za vzniku meristemoidu (M), ten se dále diferencuje v mateřskou buňku průduchu (GMC), ze které se vyvine průduch. Pro přechod z jedné vývojové fáze do druhé je potřeba postupná aktivace bHLH (basic helix-loop-helix) transkripčních faktorů (**Obr. 2**). Patří mezi ně *SPEECHLESS* (*SPCH*), *MUTE*, *FAMA* ve spolupráci s bHLH proteiny *SCREAM* (*SCRM/ICE1*) a *SCRM2* (Qi and Torii 2018; Vaten and Bergmann 2012).



Obr. 2: Schéma postupného vývoje průduchů u *Arabidopsis* s geny zajišťujícími a ovlivňujícími vývoj. Zeleně jsou napsány geny působící pozitivně na vývoj průduchů, červeně geny působící na vývoj negativně, modře jsou polární geny. Buňky, které jsou žlutě představují meristemoidy (M), oranžově - mateřskou buňku průduchu (GMC), červeně – svěrací buňky průduchu a šedé představují mateřské buňky meristemoidu (MMC). Vpravo dole je běžné rozmístění průduchů u mladého listu (Vaten and Bergmann 2012).

SPCH je důležitý pro založení linie, ze které vznikne průduch, a pro první asymetrické dělení (MacAlister et al. 2007; Pillitteri and Torii 2007). Po asymetrickém dělení mizí ze sesterské buňky meristemoidu, ale u meristemoidní buňky zůstává a potenciálně se podílí na dalším asymetrickém dělení (Robinson et al. 2011; Vaten and Bergmann 2012). *MUTE* je potřebný pro ukončení asymetrického dělení a podporu diferenciaci buněk (M-GMC) (Pillitteri and Torii 2007; Qi and Torii 2018; Vaten and Bergmann 2012). Dokončení vývoje průduchu řídí *FAMA*, který podporuje diferenciaci svěracích průduchových buněk a brání dalšímu dělení (Ohashi-Ito and Bergmann 2006). Všechny tři výše zmíněné bHLH transkripční faktory mohou utvářet heterodimery s *SCRM* a *SCRM2*, které jsou rozhodující pro správnou funkci *SPCH* a regulaci exprese dalších genů (Kanaoka et al. 2008). Stabilita bHLH proteinů a tím i celý vývoj průduchů je u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ovlivňována kaskádou mitogenem aktivovaných proteinkináz (mitogen-activated protein kinase – MAPK) skládající se z *YODA* (*YDA*), *MKK4/5/7/9* a *MPK3/6* (Qi and Torii 2018).

Správný vývoj a rozmístění průduchů je zajišťován mnoha geny. Velká část z nich byla identifikována u mutantů s narušeným nebo abnormálním vývojem. Množství průduchů je převážně ovlivňováno negativní zpětnou vazbou což znamená, že čím více je produktů daného genu, tím méně se vyvine meristemoidů a z nich poté průduchů. Produkty genů ovlivňují vývoj svou specifickou rolí v signální kaskádě vývoje průduchů. Dle současných poznatků spouští kaskádu *EPIDERMAL PATTERNING FACTORS* (*EPF1*, *EPF2* a *STOMAGEN*), které se váží na receptorové kinázy bohaté na leucin (leucin-rich repeat receptor kinases - LRR-RKs). Ty aktivují MAPK kaskádu, která fosforyluje bHLH proteiny a tím, jak již bylo zmíněno, ovlivňuje jejich stabilitu (Zoulias et al. 2018).

EPF1 a *EPF2* patří mezi negativní regulátory diferenciací průduchů (Hara et al. 2007). *EPF1* i *EPF2* kódují malé sekreční proteiny, jejichž aktivita je závislá na vazbě na LRR-RKs a jejich přidružené receptorům podobné proteiny bohaté na leucin (leucin-rich repeat receptor-like proteins - LRR-RLPs) a to především na *ERECTA* (*ER*) a *TOO MANY MOUTHS* (*TMM*) receptory (Hara et al. 2009; Zoulias et al. 2018). *EPF1* je exprimován v průduchových buňkách a v GMC, kde reguluje asymetrické dělení (Hara et al. 2007). *EPF2* vzniká hlavně v MMC a v mladších meristemoidních buňkách a inhibuje vznik buněk, ze kterých se vytvářejí meristemoidy (Hara et al. 2009).

Jedním z nejvíce známých pozitivních regulátorů (čím více je produktů daného genu, tím více se vyvine průduchů) je *STOMAGEN* (Sugano et al. 2010) známý také jako *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 9* (*EPFL9*), který je rovněž řazen mezi *EPF* (Kondo et al. 2010; Zoulias et al. 2018). K jeho expresi dochází v buňkách mezofylu, odkud je transportován do epidermis (Kondo et al. 2010). Pozitivně působící *STOMAGEN* se váže na stejné místo *ER* receptorů jako negativně působící *EPF1* a *EPF2* (Kondo et al. 2010; Sugano et al. 2010), navzájem si konkurují o vazebné místo

Všechny tři *EPIDERMAL PATTERNING FACTORS* jsou tvořeny jako propeptidy, které je potřeba upravit proteázou (Zoulias et al. 2018). Jedna ze známých proteáz je produktem genu *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1* (*SDD1*), který je také potřebný k inhibici nadměrného dělení a seskupování průduchů (von Groll et al. 2002). Při mutaci *SDD1* se na listech *Arabidopsis* dvakrát až čtyřikrát zvyšuje SD a průduchy se seskupují do klastrů (porušují pravidlo alespoň jedné vmezežené buňky). Opačnou reakci, tedy snížení SD, vyvolává nadměrná exprese genu *SDD1*. Druhou dnes známou proteázou je *CO₂ RESPONSE SECRETED PROTEASE* (*CRSP*), která štěpí *EPF2*, důsledek tohoto procesu ale není znám (Engineer et al. 2016).

Skupina genů *ERECTA* (*ER*) kóduje receptorům podobné kinázy bohaté na leucin (LRR-RKs) mající vliv nejen na vývoj průduchů, ale i na celkový vývoj rostlin a reakci na abiotický a biotický stres (Shpak et al. 2004; Villagarcia et al. 2012). *ER* jsou lokalizované v cytoplasmatické membráně a jejich extracelulární část reaguje s EPF faktory (Zoulias et al. 2018).

Jedním z prvních identifikovaných genů majících vliv na vývoj průduchů byl gen *TOO MANY MOUTHS* (*TMM*) (Yang and Sack 1995), který patří mezi důležité LRR-RLPs. Rostlinní *tmm* mutanti mají průduchů seskupené do klastrů obsahujících až 26 svěřacích buněk, vyšší počet meristemoidních buněk na děložních listech a žádné průduchy v květenství. *TMM* reguluje vznik průduchů v několika fázích vývoje, omezuje vývoj meristemoidů tak, že na daném místě vzniká jen jedna GMC, a zamezuje seskupování průduchů a tvorbě klastrů. *TMM* je dále potřebný pro správný průběh vývoje buňky v závislosti na její pozici, řídí rovinu dělení a rovnováhu mezi diferenciací průduchových a epidermálních buněk (Nadeau and Sack 2002). Mutace *tmm* v kombinaci s nadměrnou expresí genu *SDD1* se chová epistaticky (“zakrývá“ fenotyp odpovídající nadbytku *SDD1*), což potvrzuje závislost funkce *SDD1* na aktivitě *TMM*.

2.3 Fytohormony ovlivňující vývoj průduchů

Růst a vývoj rostlin ovlivňují také rostlinné hormony (fytohormony). Mezi fytohormony se řadí auxiny, kyselina abscisová (ABA), brassinosteroidy, gibereliny, etylen, cytokininy či hormonální látky jako kyselina jasmínová, polyaminy, oligosachariny, strigolakton a kyselina salicylová. Na vývoj průduchů působí jen některé z nich.

Brassinosteroidy ovlivňují metabolismus a vývoj rostlin, podporují dělení a zvětšování buněk. Podle některých studií potlačují vývoj průduchů interakcemi s YDA MAPK kaskádou (Kim et al. 2012; Qi and Torii 2018).

Auxin podporuje buněčné dělení, diferenciaci cévních svazků a ovlivňuje umístění jednotlivých buněk i orgánů, včetně umístění květů na konci stonku (Yamaguchi et al. 2013). V poslední době byl zjištěn i jeho vliv na vývoj průduchů (Qi and Torii 2018; Saibo et al. 2003).

Kyselina abscisová je hormon, který je produkován v reakci na vnější faktory zejména při nedostatku vody, chladu, salinitě, poranění či infekci a pomáhá rostlinám přizpůsobit se těmto stresovým podmínkám (Taitz and Zeiger 2002). Inhibuje růst, urychluje opad listů vstup do dormance a uzavírání průduchů (viz 2.5).

Vliv na vývoj průduchů mají dále například i ethylen a gibbereliny, které zvyšují SD v hypokotylech *Arabidopsis* (Saibo et al. 2003) či cytokininy, jejichž vliv studovali Farber, et al. (2016) u rajčat (*Solanum lycopersicum*).

2.4 Environmentální faktory ovlivňující vývoj průduchů

Vývoj průduchů je také, jak již bylo zmíněno dříve, ovlivňován vnějšími podmínkami a “potřebami rostliny“. Mezi nejdůležitější podmínky prostředí ovlivňující vývoj průduchů patří intenzita a vlnová délka záření, délka fotoperiody, teplota listu, koncentrace CO₂ a vzdušná a půdní vlhkost (Qi and Torii 2018; Vráblová 2017). V závislosti na prostředí se mění velikost, hustota průduchů na plochu (SD) a průduchový index (SI). SI je dán poměrem mezi množstvím průduchových buněk a součtem všech buněk epidermis listu (průduchové buňky + dlaždicovité buňky). Počet a velikost průduchů určuje maximální průduchovou vodivost (g_s) a má výrazný vliv na proces fotosyntézy a efektivitu využití vody (WUE – water use efficiency) (Berryman et al. 1994). WUE znamená, že rostlina se snaží udržovat rovnováhu mezi dostatečným příjmem CO₂ a přijatelnou ztrátou vody během transpirace.

Signál o vnějším prostředí je nově se vyvíjejícím listům transportován ze starších, plně autotrofních listů. Starší listy jsou v přímém kontaktu s vnějším prostředím, ale oproti nově se vyvíjejícím listům již nemohou příliš regulovat svou SD. Mechanismus transportu signálu studovali Lake et al. (2001) na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Starší listy vystavili zvýšené koncentraci CO₂ s nižší intenzitou světla a sledovali vliv na nově se vytvářející listy rostoucí v odlišných podmínkách. Nově utvářené listy získaly fenotyp odpovídající zvýšené koncentraci CO₂, tedy podmínkám kolem dospělého listu. Pokud ale vystavili vyšší koncentraci pouze nově se vyvíjející listy, nebyl prokázán žádný vliv. Podobně se projevila i různá intenzita záření, které byly vystaveny buď starší, nebo nově se utvářející listy. Podle Cassona a Hatheringtona (2014) je součástí kaskády přenosu signálu ze starších do nově se vyvíjejících listů fytochrom B (phytochrom B – phyB). Mutanti phyB ztratili možnost regulovat mladé listy signálem a nereagovali na změněné podmínky.

2.4.1 Vliv záření

Při vyšší intenzitě světla se zvětšuje průduchový index (SI) a průduchová hustota (SD) (Lake et al. 2001). Signál o intenzitě záření zachycený dospělými listy ovlivňuje vývoj průduchů u mladých listů. Pro vnímání intenzity světla mají rostliny fotoreceptory, mezi

které řadíme fytochromy B a A, kryptochromy CRY1 a CRY2 a fotoropiny. Fytochrom B je hlavní pro vnímání záření červeného spektra (650-680 nm) a fytochrom A pro vnímání dlouhovlnného červeného světla (710 – 740 nm) (Casson et al. 2009; Kang et al. 2009). Kryptochromy se uplatňují hlavně při vnímání v oblasti modrého a UV-A záření (Cashmore et al. 1999).

2.4.2 Dostupnost vody

Nízký vodní potenciál v rostlinách může vznikat při nedostatku vody nebo vysokém osmotickém tlaku. U trav je při nedostatku půdní vody snížen počet průduchů (Xu and Zhou 2008). Podobnou reakci na osmotický stres zaznamenal u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) i Kumri et al. (2014). Na druhou stranu, ale Xu a Zhou (2008)(2008) zjistili, že při mírném nedostatku půdní vody může být počet nových průduchů větší. To ukazuje, že rostliny regulují efektivitu využití vody pomocí regulace vývoje průduchů pro co nejlepší optimalizaci růstu (Qi and Torii 2018).

2.4.3 Oxid uhličitý

Se zvyšující se koncentrací oxidu uhličitého se mění globální klima. Od roku 1750, tedy od předindustriálních dob se zvýšila koncentrace oxidu uhličitého z 280 $\mu\text{mol/mol}$, na dnešních 408 $\mu\text{mol/mol}$ s předpokladem, že do konce 21. století se zvýší na 900 $\mu\text{mol/mol}$ (Neftel et al. 1985; IPCC. 2013). Podle Bacastova et al. (1973) vzrostla mezi roky 1959 a 1971 průměrná koncentrace CO_2 o 3,4 %. Duben 2014 byl první měsíc v zaznamenané historii, kdy byla koncentrace CO_2 nad 400 $\mu\text{mol/mol}$ (Engineer et al. 2016). Woodward (1987) poukazuje na to, že podle fosilního záznamu poklesla u rostlin SD v reakci na post-industriální zvýšení koncentrace CO_2

Woodward and Kelly (1995) porovnali u 100 rostlinných druhů reakci na zvýšení koncentrace CO_2 a ve většině případů (74%) zjistili snížení SD. Zvýšená koncentrace CO_2 způsobuje snížení nejen SD a SI (Woodward 1987), ale také průduchové vodivosti (g_s) (Medlyn et al. 2001), transpirace listu (Engineer et al. 2016; Long et al. 2004; Teng et al. 2009). Obecně platí, že vyšší koncentrace CO_2 v chloroplastech zlepšuje fixaci CO_2 rostlinou a tím potenciálně růst a produkci rostlin (Ainsworth and Rogers 2007). Vyšší koncentrace CO_2 v atmosféře může vést ke zvýšení koncentrace CO_2 v mezibuněčných prostorech listů (C_i) (Engineer et al. 2016), které následně může způsobit zavírání průduchových pórů a tím snížení g_s . Naopak nižší C_i stimuluje otevírání průduchů. Snížení g_s při vyšší koncentraci

CO₂ může při zachování stejné rychlosti fixace CO₂ omezit ztrátu vody z listů a tím zvyšovat WUE. Lepší hospodaření s vodou může být pro rostliny zásadní zvláště při kolísání klimatu s obdobími nedostatku vody (Engineer et al. 2016; Leakey et al. 2009; Xu and Zhou 2008). Uzavřenější průduchy v reakci na zvýšené CO₂ také omezuje ochlazování listů transpirací, což může způsobit tepelný stres rostlin (Engineer et al. 2016; Leakey et al. 2009). Produktivita rostlin je tak při zvýšené koncentraci CO₂ a nedostatku vody většinou nižší, než je předpokládáno, a tepelný stres v kombinaci se suchem může zhoršit i zdravotní stav rostlin (Easlon and Bloom 2013).

Přestože vliv složení atmosféry na vývoj průduchů je znám, stále není objasněné, jak je signál vnímán a co způsobuje změny ve vývoji. Prvním identifikovaným genem ovlivňujícím vývojové reakce rostlin v závislosti na složení atmosféry byl gen HIGH CARBON DIOXIDE (*HIC*) (Gray et al. 2000). *hic* mutanti nemají při normálních podmínkách žádný viditelný defekt, jejich průduchy vypadají stejně jako průduchy divokých typů rostlin a fungují standardně. Při zvýšené koncentraci CO₂ v okolní atmosféře se u *hic* mutantů výrazně zvyšuje SD i SI, při dvojnásobné koncentraci CO₂ se zvýší SD až o 42%. Oproti tomu se u kontrolních rostlin při stejně zvýšené koncentraci CO₂ neprojeví žádná významná změna v SD ani SI. Není zatím známo, jak k ovlivnění vývoje průduchů dochází. Podle Graye a spol. (2000) je gen *HIC* shodný s genem *KCS*, který kóduje 3-ketoacyl koenzym A (CoA). CoA je zapojený do syntézy mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které tvoří kutikulu a kutikulární vosky, což by mohlo znamenat, že mutace v genu *HIC* narušila biosyntézu vosků listu a tím ovlivnila vývoj průduchů. U mutantů s narušenými epikutikulárními vosky, jako například u mutantů *cer1* a *cer6*, bylo pozorováno zvýšení SD i SI, což naznačuje že narušení kutikulárních vosků má vliv na vývoj průduchů (Gray et al. 2000). Narušení epikutikulárních vosků ale nebylo u mutantů *HIC* při skenování elektronovým mikroskopem prokázáno (Gray et al. 2000).

2.5 Okamžitá reakce na environmentální podmínky

Environmentální podmínky působí a ovlivňují rostliny nejen dlouhodobě při vývoji průduchů, ale také krátkodobě regulací výměny plynů otevřením či zavřením průduchů. Ovlivňují i průduchová vodivost (g_s), která závisí na počtu průduchů na plochu a otevřenosti průduchové štěrbin. Krátkodobá reakce svěřací buněk průduchů je současně ovlivňována několika podněty. Působí na ně především rostlinné hormony (ABA, auxin), světelné záření

(především červené a modré), dostupnost vody, koncentrace CO₂ v mezibuněčných prostorech a teplota (Šantrůček 1998; Schroeder et al. 2001).

Jak již bylo zmíněno, skrz průduchy rostlina přijímá z atmosféry oxid uhličitý potřebný pro syntézu organických látek během procesu fotosyntézy a transpirací vodu. Transpirace listů hraje důležitou roli při transportu vody a v ní rozpuštěných živin z kořene do nadzemních částí rostliny (Zoulias et al. 2018). Je ale potřeba vyvážit příjem CO₂ a regulovat přílišnou ztrátu vody, tedy poměr množství vody využité metabolismem rostliny k množství vody ztracené transpirací.

Otevřenost průduchů závisí na rozdílnosti turgoru ve svěracích a okolních podpůrných buňkách (Šantrůček 1998). Otvírání průduchů je dosaženo zvýšením koncentrace rozpuštěných látek (především draselných iontů) ve svěracích buňkách, které zapříčiní tok vody do buněk po jejím koncentračním spádu. Nahromaděním vody ve svěracích buňkách se zvýší turgor, který způsobí otevření průduchového póru. Zavírání průduchů je způsobeno opačnými procesy, které jsou řízeny jinými signálními drahami (Schroeder et al. 2001).

3 Stabilní izotopy a jejich využití při výzkumu funkce průduchů a listu

Svět kolem nás je tvořený různými prvky. Atom prvku se skládá z jádra a elektronového obalu. V jádře se nachází kladné protony a neutrální neutrony, elektronový obal obsahuje záporné elektrony. Prvek je charakterizován počtem neutronů (neutronové číslo – N), počtem protonů (protonové číslo – Z) a jejich součtem (nukleonové číslo – A), které se zapisují A_ZX . Počet elektronů je shodný s počtem protonů, při odtrhnutí či navázání elektronu se atom prvku mění v kladně nebo záporně nabitý iont. Z určuje daný prvek, ale N (tedy i A) se může u různých atomů v rámci prvku lišit. Tyto atomy se nazývají izotopy daného prvku, liší se v N (a A), ale Z mají stejné. Izotopy jsou různě stabilní v závislosti na rozdílnosti N. Například izotopy vodíku 1_1H a 2_1H jsou stabilní (poločas rozpadu je u nich delší než 10¹⁸ let), ale izotop 3_1H je nestabilní, tedy radioaktivní, a jeho jádro se postupně rozpadá za vzniku radioaktivního záření a přeměny v jiný prvek (Květoň 2018).

Při určování izotopového složení látek se nejčastěji používá hmotnostní spektrometrie a méně často také nesespecifické metody jako například katarometrie, refraktometrie, elektrochemie a hustotové metody či interferometrie a specifické metody jako je plynová chromatografie, spektroskopie či jaderné metody (Květoň 2018). Hmotnostní spektroskopie je založena na měření hmotnosti jednotlivých atomů prvku. Hmotnost atomu prvku se liší

mezi různými izotopy prvku a je ovlivněna především počtem protonů a neutronů (klidová hmotnost elektronů je oproti klidové hmotnosti protonů i neutronů přibližně o 4 řády nižší).

Pro vyjadřování izotopového složení látek a jejich změn se používá několik veličin. Jako první se používal izotopový poměr (R), bezrozměrná veličina, která udává poměr četnosti méně zastoupeného (minoritního - často těžšího) izotopu k více zastoupenému (majoritnímu) izotopu. Častěji je ale používáno relativní zastoupení izotopů (δ), které uvádí izotopové složení vzorku (R_{vz}) vzhledem ke standardu (R_s) a je udáváno v ‰ (Farquhar et al. 1982).

$$\delta = [(R_{vz} - R_s)/R_s] \cdot 1000 \quad \text{Rovnice 1}$$

Když je hodnota δ vyšší než nula, je ve vzorku více minoritního izotopu, látka je o minoritní izotop obohacena oproti standardu. Hodnota δ vyšší než nula naopak znamená ochuzení minoritní složky oproti standardu. Jako standardy se dříve používali izotopově homogenní přírodní látky nepodléhající chemickým změnám. Dnes jsou používány nové standardy, které mají stejné izotopové složení jako původní standardy, před názvem mají uváděno písmeno “V“, protože jsou uloženy ve Vídni (Květoň 2018).

Izotopová diskriminace (Δ) je veličina používaná k vyjádření změny poměru izotopů během reakce, tedy změny poměru izotopů při “přeměně“ reaktantu (R_r) v produkt (R_p). Také je udávána v ‰.

$$\Delta = [(R_r - R_p)/R_p] \cdot 1000 \quad \text{Rovnice 2}$$

Hodnota Δ větší, než nula znamená ochuzení produktu oproti reaktantu o minoritní izotop. Naopak Δ nižší, než nula znamená obohacení produktu o minoritní izotop.

3.1 Aplikace analýzy izotopového složení

Analýza izotopového složení bývá využívána například pro sledování osudů látek v organismu a jejich přeměn během přírodních procesů. Stabilní izotopy se také využívají na značení látek, které jsou jinak špatně analyzovatelné (převážně kvůli jejich nízké koncentraci) a sledování jejich osudu v různých chemických a fyzikálních procesech. Určování izotopového složení se ale využívá nejen pro vědecké účely, ale i pro určení či potvrzení autenticity a původu produktů rostlinného a živočišného původu. Metoda je založena na diskriminaci těžšího ^{13}C izotopu autotrofními rostlinami během procesu fotosyntézy. Míra diskriminace odráží danou lokalitu, rozšíření rostliny a způsobu fixace uhlíku. Živočichové, tedy i člověk, jsou oproti nim heterotrofní organismy získávající C jen z organických látek, především z potravy, tedy z rostlin či z živočichů, kteří ho předtím

přijali z rostlin. Podobně jako se lokálně liší obsah těžšího izotopu C v organismech, se liší i obsah těžších izotopů dalších prvků, jako například kyslíku nebo vodíku (Květoň 2018).

Proto je možné určit pomocí izotopového složení původ organických produktů, jako jsou sýry, víno, lihoviny, šunka, ale i drogy či cigarety, kontrolovat autenticitu jídla (přírodní x syntetické), původ organických tkání, jako jsou vlasy, nehty, zuby, rohy a původ vzorků zeminy. Zjišťování izotopového složení se využívá v mnoha odlišných odvětvích, například v kriminalistice či archeologii, také existují různé databáze organických produktů. Výhodou je, že pro izotopové analýzy stačí velice malé vzorky. Pro hmotnostní spektrometrii je potřeba jen 35 - 55 μg čistého uhlíku ve vzorku (tedy 70 – 110 μg suché rostlinné tkáně). Na druhou stranu ale může být toto malé množství nevýhodou, protože se může projevit i malá kontaminace vzniklá během příprav.

3.2 Uhlík a izotopová diskriminace v rostlinách

Uhlík (*Carboneum* – C) je chemický prvek, který tvoří několik izotopů. Přirozeně se vyskytuje jako stabilní izotop ^{12}C (nejhojnější, přibližně 98,8%) nebo těžší ^{13}C (přibližně 1,108% atmosférického uhlíku), či jako nestabilní, velice málo zastoupený, izotop ^{14}C (méně než 0,000000001%). Uměle byly připraveny i další izotopy uhlíku (například ^{16}C s poločasem rozpadu 20 minut), které jsou ale velice nestabilní.

Uhlík je základním stavebním prvkem všech živých organismů. Patří mezi bigenní prvky, které jsou nezbytné pro život. V rostlinném těle je spolu s kyslíkem, vodíkem a dusíkem jedním z nejdůležitějších biogenních prvků. Uhlík se v přírodě vyskytuje v čisté formě například jako grafit či diamant nebo často také jako součást anorganických či organických sloučenin. Je součástí litosféry, atmosféry i hydrosféry. Hlavním zdrojem uhlíku pro živé organismy je atmosféra. Z atmosféry je uhlík přijímán rostlinami ve formě oxidu uhličitého, který musí pro zpřístupnění dalším organismům projít fotosyntézou.

Už koncem 30. let 20. století si fyzici povšimli menší koncentrace izotopu ^{13}C v rostlinných tkáních oproti zastoupení $^{13}\text{CO}_2$ v atmosféře (Šantrůček 2018). Rostliny takzvaně diskriminují těžší izotop ^{13}C . Postupně vědci přicházeli na to, že k diskriminaci dochází v listech ve fotosyntéze (Park and Epstein 1961) konkrétně během karboxylační reakce a během difuze CO_2 z atmosféry přes hraniční vrstvu a průduchy mezofylem do chloroplastů (Farquhar et al. 1982). Dále si také povšimli rozdílnosti fixace uhlíku u různých skupin rostlin, díky které dochází k jeho rozdílné diskriminaci. Rostliny podle rozdílnosti fyziologicko-biogeochemických mechanismů fixace uhlíku rozdělili na C3, C4

a CAM rostliny. V roce 1982 Farquhar, O'Leary a Berry (1982) objevili závislost diskriminace uhlíku na koncentraci CO₂ v mezibuněčných prostorách listu, která je ovlivňována difuzí a environmentálními faktory jako je světlo, teplota, salinita a sucho. Odvodili také vztah udávající v ‰ rozdíl mezi relativním zastoupením izotopu ¹³C v mezibuněčných prostorách (δ_i) a v atmosféře (δ_a), ve kterém započítali vliv parciálního tlaku neboli koncentrace CO₂ v atmosféře (C_a) i mezibuněčných prostorách (C_i) a vliv tzv. frakcionačních faktorů, diskriminace ¹³C během difuze vzduchem (a, 4,4‰) a karboxylační reakce (b, 30‰) (Farquhar et al. 1982).

$$\delta_i - \delta_a = \frac{C_a - C_i}{C_a} (b - a) \quad \text{Rovnice 3}$$

Diskriminace uhlíku u rostlin je zkoumána dodnes a nachází uplatnění i v dalším výzkumu.

Cíle práce

1. Sepsat literární rešerši zabývající se vývojem průduchů na listu dvouděložných rostlin s důrazem na vliv abiotických faktorů.
2. Otestovat potenciální metodické problémy při vyhodnocování pokusů zkoumajících vývoj průduchů a listu:
 - a. Kdy je správný čas na odebrání otisků pokožky listu? Vliv stáří listu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a řeřichy seté (*Lepidium sativum*) na SD, SI a plochu listu.
 - b. Způsob přípravy vzorků na izotopové analýzy bez hrozby kontaminace.

Praktická část

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Pro studii vlivu stáří rostliny na SD, SI a plochu prvního pravého listu byl použit huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) a řeřicha setá (*Lepidium sativum*), vyšší, dvouděložné rostliny patřící do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Rostliny byly pěstovány v zahradnickém substrátu. *A. thaliana* rostl v osmi kulatých květináčích s průměrem 18,5 cm a výškou 3,4 cm přibližně po 20 jedincích v každém z nich. Přibývajícím jedincům byli průběžně

vytrhávání tak, aby si rostliny v květináči co nejméně konkurovaly o světlo a vodu a zůstali zde jedinci, kteří vyklíčili jako první, tím bylo zajištěno stejné stáří zkoumaných rostlin. Rostliny *L. sativum* byly pěstovány v deseti květináčích se stranou horní čtvercové obruby 15,8 cm a výškou 14 cm.

Pěstování probíhalo od poloviny srpna do poloviny září. U rostlin byly Minikin i-line datalogery (EMS Brno) měřící v desetiminutových intervalech světelné (Photosyntheticly Active Radiation, PAR), teplotní (T) a vlhkostní (Relative humidity, RH) podmínky, které jsou pro *A. thaliana* shrnuty v **Tab. 1** a pro *L. sativum* v **Tab. 2**. Průměrná délka dne (tedy doba, kdy $PAR > 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pro *A. thaliana* byla 11,6 hodin a pro *L. sativum* 10,7 hodin.

Pro druhou studii, srovnání způsobu přípravy vzorků na izotopové analýzy bez hrozby kontaminace, byly použity rostliny tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Rostliny byly pěstovány ve skleníku s nastavenou teplotou 18-25°C (při vyšší teplotě se zapnulo chlazení, při nižší topení). Od 6:00 do 18:00 bylo ve skleníku zapnuté umělé přisvícení, jinak intenzita světelného záření odrážela vnější podmínky, během vysoké oblačnosti byla u rostlin přibližně v rozmezí 150-200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tab. 1: Souhrn světelných, teplotních a vlhkostních podmínek u rostlin *Arabidopsis thaliana*.

<i>Lepidium sativum</i>					
	medián	Průměr	1. quartil	3. quartil	Max
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	55,7	85,7	4,1	126,0	722,7
RH (%)					
den	56,2	56,5	48,2	64,0	83,5
noc	61,2	61,2	54,8	67,7	78,1
T (°C)					
den	20,0	19,2	16,3	23,4	33,2
noc	17,5	16,6	12,0	21,9	27,1

Tab. 2: Souhrn světelných, teplotních a vlhkostních podmínek u rostlin *Lepidium sativum*.

<i>Lepidium sativum</i>					
	medián	Průměr	1. quartil	3. quartil	Max
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	8,3	13,0	3,2	22,5	76,6
RH (%)					
den	46,3	51,8	39,6	57,8	100,0
noc	91,0	84,0	77,6	100,0	100,0
T (°C)					
den	20,9	21,2	19,6	22,4	27,6
noc	19,9	20,4	18,8	21,8	27,5

4.2 Průduchová hustota a průduchový index

Průduchová hustota (SD) a průduchový index (SI) byl zjišťován u rostlin *A. thaliana* a *L. sativum*. Po objevení prvního pravého listu ($t=0$) byly odebírány listy vždy ze tří různých rostlin, z každé rostliny byly udělány mikroreliefovou otiskovou metodu (na list nanese tenká vrstva bezbarvého laku, po zaschnutí přenesena na podložní sklíčko pomocí průhledné izolepy) otisky zvlášť z horní (adaxiální) a dolní (abaxiální) strany prvního pravého listu.

Prvních pět dní byly listy odebírány každý den, poté se perioda oděrů prodlužovala až do dosažení 35. dne ($t=35$) (**Tab. 3**). U *A. thaliana* byly vždy odebrány z jedné rostliny oba pravé listy, jeden z nich byl použit pro otisk horní strany listu a druhý pro dolní stranu. U *L. sativum* byly od osmého dne po objevení prvních pravých listů (díky již dostatečné velikosti listů) otisky horní i dolní strany odebírány z jednoho listu po jeho rozpůlení, čímž byly získány více objektivní výsledky.

Tab. 3: Rozvržení odběrů listů u *Arabidopsis thaliana* a *Lepidium sativum*.

Rostlinný druh	Stáří prvních pravých listů (dny)														
<i>L. sativum</i>	1	2	3	4	5	6	8	10	12	14	16	22	28	35	-
<i>A. thaliana</i>	1	2	3	4	5	6	8	10	12	14	16	19	23	29	35

SD a SI bylo počítáno pomocí optické mikroskopie (Olympus BX61). Pokud to velikost listové plochy dovoľovala bylo z každého otisku digitálním fotoaparátem (750D Cannon) při zvětšení 500x pořízeno pět fotografií s plochou 0,130 mm² zachycujících nepřekrývající se místa na listu. Při menší velikosti plochy listu byla nasnímána celá plocha otisku. Z fotografií byl v programu ImageJ zjištěn počet jednotlivých buněk. Kvůli problematické definici a obtížné diverzifikaci meristemoidů (*meristemoids* - M) a mateřských buněk průduchů (*guard mother cells* - GMC) byly tyto buňky počítány dohromady jako nedovyvinuté průduchové buňky (*undeveloped stomatal cells* - USC). A mateřské buňky meristemoidů (*meristemoid mother cell* – MMC), které nejsou na snímcích z optického mikroskopu vizuálně odlišitelné od dlaždicovitých buněk (*pavement cells* – PVC) byly zahrnuty mezi dlaždicovité buňky. Na otiscích tedy byly počítány dlaždicovité buňky (PVC), nedovyvinuté průduchové buňky (USC) a vyvinuté průduchy (*stomatal cells* – SC).

Z počtů buněk byla vypočtena hustota SD, hustota PVC, hustota nedovyvinutých průduchových buněk USC a SI pro každou stranu listu dané rostliny. Hustoty jednotlivých typů buněk byly vypočteny jako počet daných buněk na jeden mm² plochy listu. SI byl vypočten podle Rovnice 4, kde SC označuje počet průduchů, USC počet nedovyvinutých průduchových buněk a PVC počet dlaždicovitých buněk na 1 mm² plochy listu.

$$SI=SC/(SC+USC+PVC) \quad \text{Rovnice 4}$$

4.3 Plocha listů

Listy *A. thaliana* a *L. sativum*, ze kterých byly odebrány otisky, byly oboustrannou lepicí páskou připevněny na papír a naskenovány do počítače. V programu ImageJ byla obrazovou analýzou následně zjištěna jejich plocha (mm²).

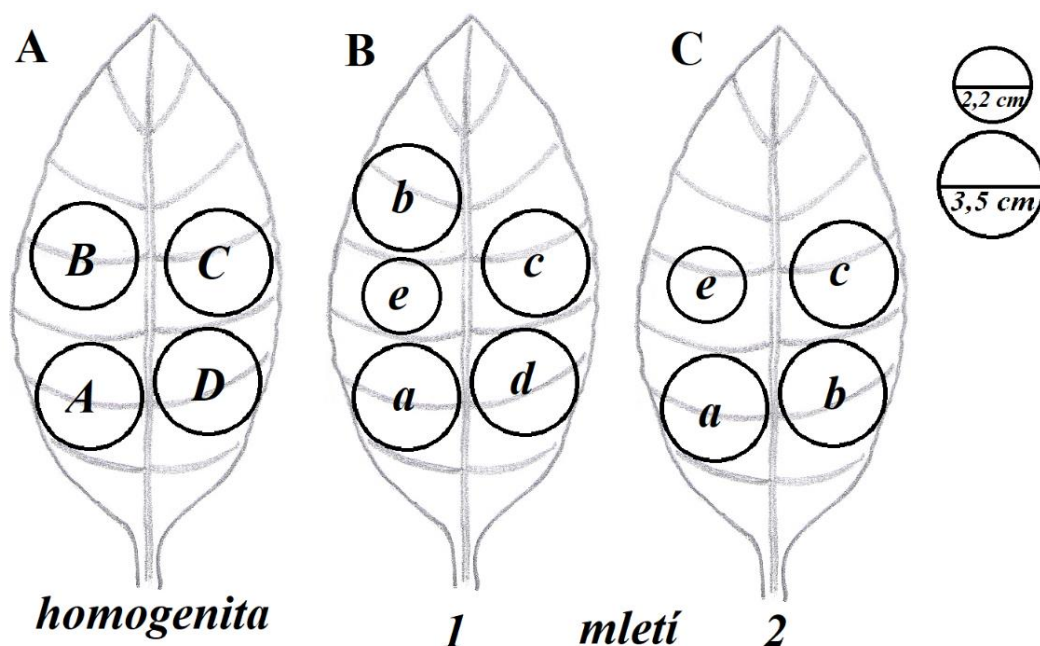
4.4 Příprava vzorků pro izotopovou analýzu

4.4.1 Kontrola homogenity

Ze tří listů rostliny *Nicotiana tabacum* byly vyseknuty 4 terčíky o průměru 3,5 cm, s plochou 9,62 cm² (**Obr. 3A**), které byly vysušeny do konstantní hmotnosti (3 dny, při 60°C) a ručně namlety v achátové třecí misce (**Obr. P1**). Achát je mechanicky odolný a neobsahuje uhlík oproti například keramickým třecím miskám či polypropylenovým mikrozkuřavkám, které jsou vyráběny z fosilních paliv (ropy) a proto mají vlastní ¹³C izotopový signál. Hmotnostní spektrometrií bylo zjištěno jejich izotopové složení (δ¹³C), které bylo srovnáno pomocí jednocestné ANOVY, což umožnilo zkontrolovat homogenitu izotopového složení sušiny listu v rámci celé plochy listu.

4.4.2 Příprava vzorků pro izotopovou analýzu

Pro kontrolu přípravy vzorků pro izotopovou analýzu byly opět odebrány listy z několika rostlin *Nicotiana tabacum*. Z každého listu byly korkovrtem vyseknuty 3-4 terčíky o průměru 3,5 cm, s plochou 9,62 cm² a jeden terčík s průměrem 2,2 cm a plochou 3,80 cm² (**Obr. 3B, C**). Terčíky byly dány do zvážených mikrozkuřavek dvou odlišných značek Eppendorf nebo Kartel a poté 3 dny sušeny při 60°C do konstantní váhy (**Tab. 4**).



Obr. 3: Rozložení, umístění na listu a velikost terčků pro jednotlivé typy izotopových analýz. A) Rozložení výseků použitých pro kontrolu homogenity vzorků z ručního mletí. B) Výseky použité pro srovnání vlivu doby mletí v mikrozkuřavkách Eppendorf, *a* označuje ruční mletí, tedy kontrolu, *b-d* se liší délkou mletí na kulovém mlýnu (30s, 60s, 3 min), terčik *e* s menší plochou byl mletý po dobu 30 s. C) Výseky mleté v mikrozkuřavkách Kartel, terčik *a* označuje ruční mletí, terčiky *b-c* byly mlety na kulovém mlýnu po dobu 30s (*b, e*) nebo 3 min (*c*).

Tab. 4: Shrnutí váhy sušiny terčků v závislosti na ploše terčků.

	vzorek	plocha cm ³	sušina (mg)		
			průměr (mg)	směrodatná odchylna	medián
Eppendorf	a	9,61	3,08	0,53	2,99
	b	9,61	3,23	0,49	3,13
	c	9,61	3,25	0,48	3,13
	d	9,61	3,11	0,54	3,05
	e	3,80	1,20	0,23	1,14
Kartel	a	9,61	5,01	0,32	5,09
	b	9,61	4,97	0,52	5,04
	c	9,61	5,81	0,41	5,86
	d	3,80	2,29	0,13	2,30

Po vysušení byly vzorky namlety ručně v achátové třecí misce nebo na kulovém mlýnu (Retsch MM200, Haan, Německo) s rozdílnou dobou mletí při frekvenci 30 kmitů/s v polypropylenových mikrozkuřavkách, do kterých byly dány dvě kuličky z nerezové oceli o průměru 3 mm. Srovnání způsobu mletí vzorků pro izotopovou analýzu bylo prováděno dvakrát. Zprvé byly vzorky mlety v mikrozkuřavkách značky Eppendorf s garantovanou

výdrží centrifugace 25000*g. Vzorky (**Obr. 3B**) byly mlety různě dlouhou dobu – 30s, 60s a 3 min (**Tab. 5**). Zadruhé byly vzorky mlety v mikrozkumavkách značky Kartel s horšími fyzikálními vlastnostmi, kde je garantovaná výdrž při centrifugaci 11000*g. Byly použity jen krajní doby mletí a to 30 s a 3 min (**Obr. 3C, Tab. 5**). Pro následné porovnání byly ještě naškrábáním a rozemletím části mikrozkumavek připraveny 3 vzorky z každého typu mikrozkumavek (Eppendorf, Kartel). Tak bylo možné zhodnotit vliv značky a kvality mikrozkumavky na možnou kontaminaci vzorků.

Tab. 5: Typy mletí pro jednotlivé terčíky, rozmístění na listu je zobrazeno na **Obr. 3**.

Terčík	mletí 1 - Eppendorf	mletí 2 - Kartel
<i>a</i>	třecí miska	třecí miska
<i>b</i>	mlýnek 30 s	mlýnek 30 s
<i>c</i>	mlýnek 60 s	mlýnek 3 min
<i>d</i>	mlýnek 3 min	mlýnek 30 s (menší terčík)
<i>e</i>	mlýnek 30 s (menší terčík)	-

4.5 Izotopové analýzy

U jednotlivých vzorků bylo hmotnostní spektrometrií zjištěno relativní zastoupení izotopu ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$). Ze suchých, namletých vzorků bylo zabaleno do cínových kapslí množství v rozmezí 690 – 950 μg . Kapsle se vzorky byly v prvkovém analyzátoru (NC 2100 Soil, ThermoQuest CE Instruments, Rodano, Itálie) spáleny v proudu kyslíku při 950°C za vzniku CO_2 . Poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ byl zaznamenán hmotnostním spektrometrem (Delta plus XL, ThermoFinnigan, Bremen, Německo) propojeným s prvkovým analyzátozem. Relativní zastoupení izotopu ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) bylo vypočteno rozdílem izotopového složení (poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) vzorku (R_{vz}) vzhledem ke standardu VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) (R_{s}) (Rovnice 5). Měření standardu probíhalo se standardní odchylkou menší než 0,1 ‰.

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{vz}} - R_{\text{s}})/R_{\text{s}}] \cdot 1000 \quad \text{Rovnice 5}$$

Pro následné statistické zhodnocení, jak moc se izotopový signál $\delta^{13}\text{C}$ blíží kontrole (ručně mletý v achátové třecí misce) či izotopovému signálu mikrozkumavky, byla vypočtena frakce (f) (Rovnice 6). Kde δ_{z1} je izotopový signál kontroly, δ_{z2} izotopový signál mikrozkumavky, δ_{v} izotopový signál vzorku a f_2 je frakce vzorku pocházející z kontaminace mikrozkumavkou f_1 (‰).

$$\delta_v = f_1 \cdot \delta_{z1} - f_2 \cdot \delta_{z2} \quad \text{Rovnice 6}$$

$$f_1 + f_2 = 1$$

$$f_2 = \frac{\delta_v - \delta_{z1}}{\delta_{z2} - \delta_{z1}}$$

4.6 Statistické vyhodnocení

Pro statistické zpracování získaných dat byl použit program Statistica (StatSoft CR). Homogenita vzorků z ručního mletí byla vyhodnocována jednocestnou ANOVOU, rozdíly v délce mletí a v použité mikrozkuhavce byly vyhodnoceny dvoucestnou ANOVOU. Pro následné srovnání jednotlivých skupin byl použit post-hoc Tukeyův test.

Data získaná z otisků listů nebyla statisticky zpracována.

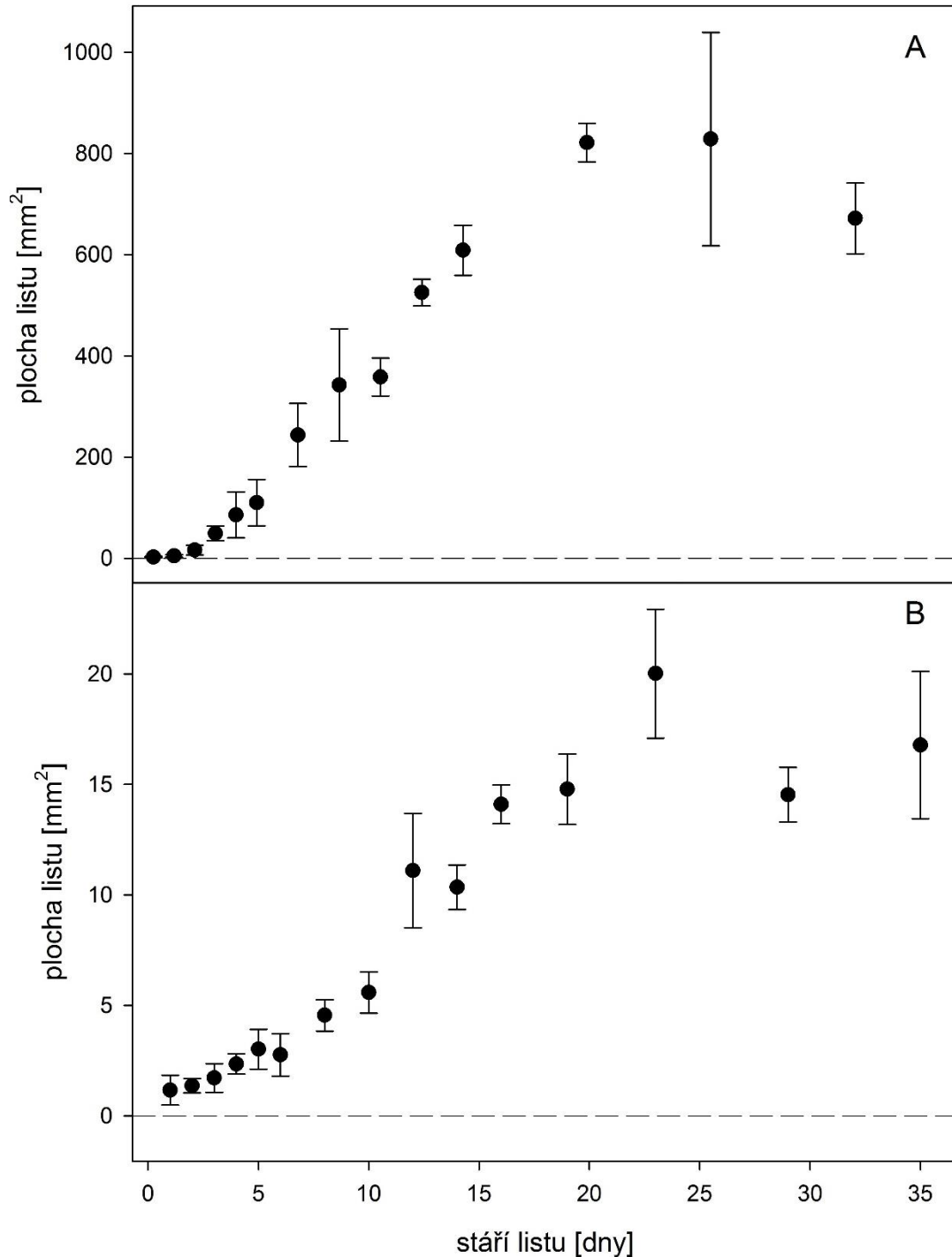
5 Výsledky

5.1 Vliv stárnutí listu na SD, SI a plochu listu

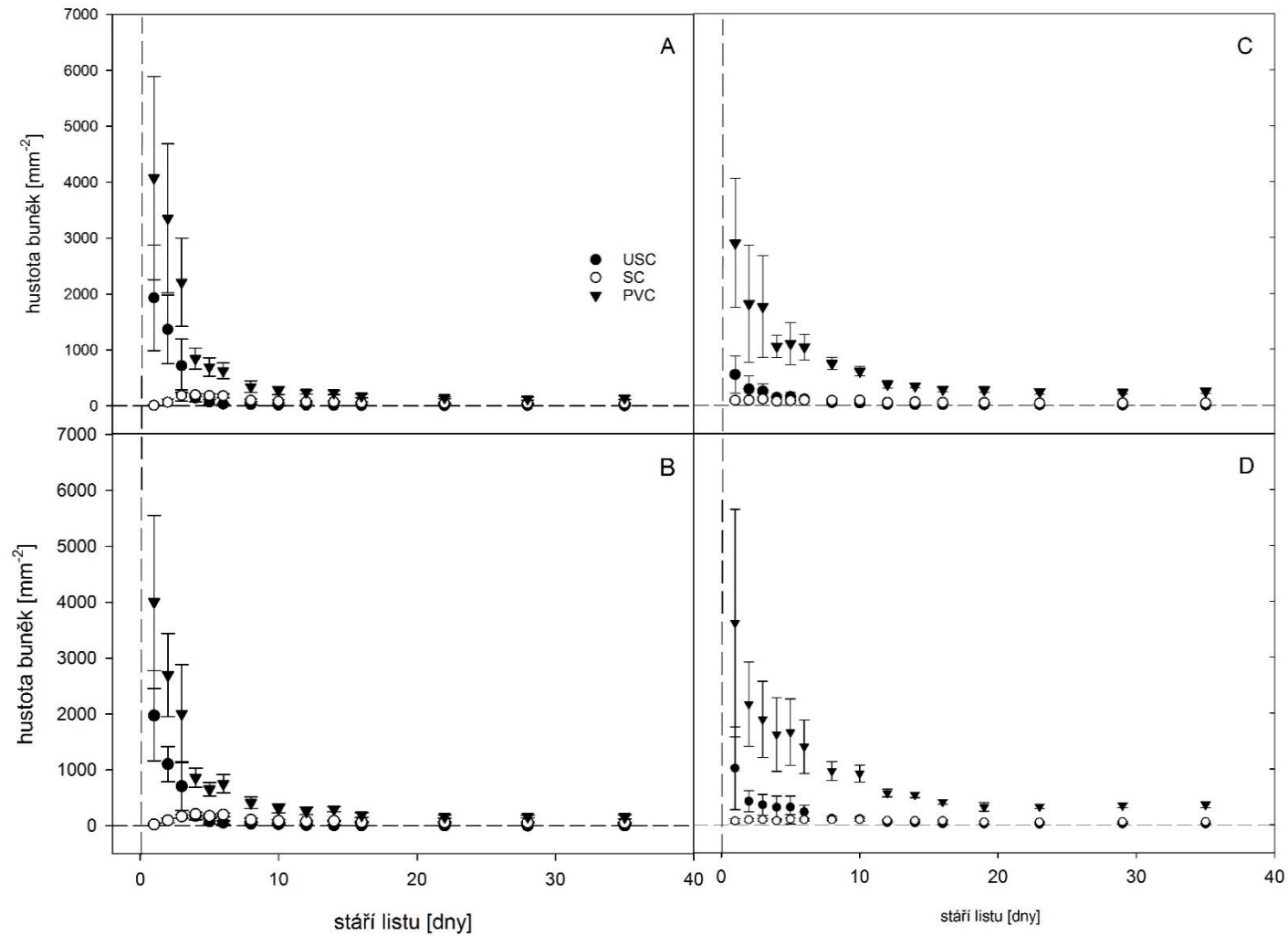
Když se list vyvíjí a stárne, zvětšuje se po určité dobu jeho plocha, tvoří se nové buňky listu a zvětšují se již existující buňky listu. Tato práce se zabývá vývojem buněk pokožky, a to především průduchů, v závislosti na stáří a ploše prvních pravých listů. Do určité doby se vytváří meristemoidy a z nich průduchy. Po čase už se počet průduchů nenavýšuje, buňky listu se dospíváním listu zvětšují a průduchy se tím od sebe oddalují. Neboli zmenšuje se hustota průduchů (SD), tedy počet průduchů na danou jednotku plochy klesá, dokud se neustálí konečná velikost listu a tím i jeho SD. U každé rostliny trvá ustálení velikosti listu různě dlouho. Na **Obr. 4** je znázorněn růst plochy prvních pravých listů rostlin *Lepidium sativum* v závislosti na stárnutí listu, kde je vidět, že nejstrměji rostla plocha mezi 6. až 16. dnem a ustálila se po 22. dnu. Výsledná plocha listů *Arabidopsis thaliana* (**Obr. 4**) byla 40x menší než u *L. sativum*. Listy nejvíce rostly mezi 8. až 23. dnem. U obou druhů rostlin se plocha listů po 28. dnu začala snižovat což mohlo být způsobeno vlivem senescence, stárnutí, sesychání a zkrabacení listů, čímž se po vyrovnání listu před nafocněním plocha opticky zmenšila.

Graf porovnávající množství nevyvinutých průduchových (USC), průduchových (SC) a dlaždicovitých (PVC) buněk na plochu 1 mm² během vývoje prvních pravých listů *L. sativum* a *A. thaliana* na adaxiálních a abaxiálních stranách listů (**Obr. 5**) ukazuje, že u rostlin *L. sativum* byla nejvyšší hustota buněk na adaxiální straně přibližně 1,5x větší

než u rostlin *A. thaliana*, ale na abaxiální straně se příliš nelišila. Počet buněk na jednotku plochy vždy stárnutím listu klesá, což potvrzuje již dříve uvedené, že se buňky stárnutím zvětšují a tím se od sebe oddalují.

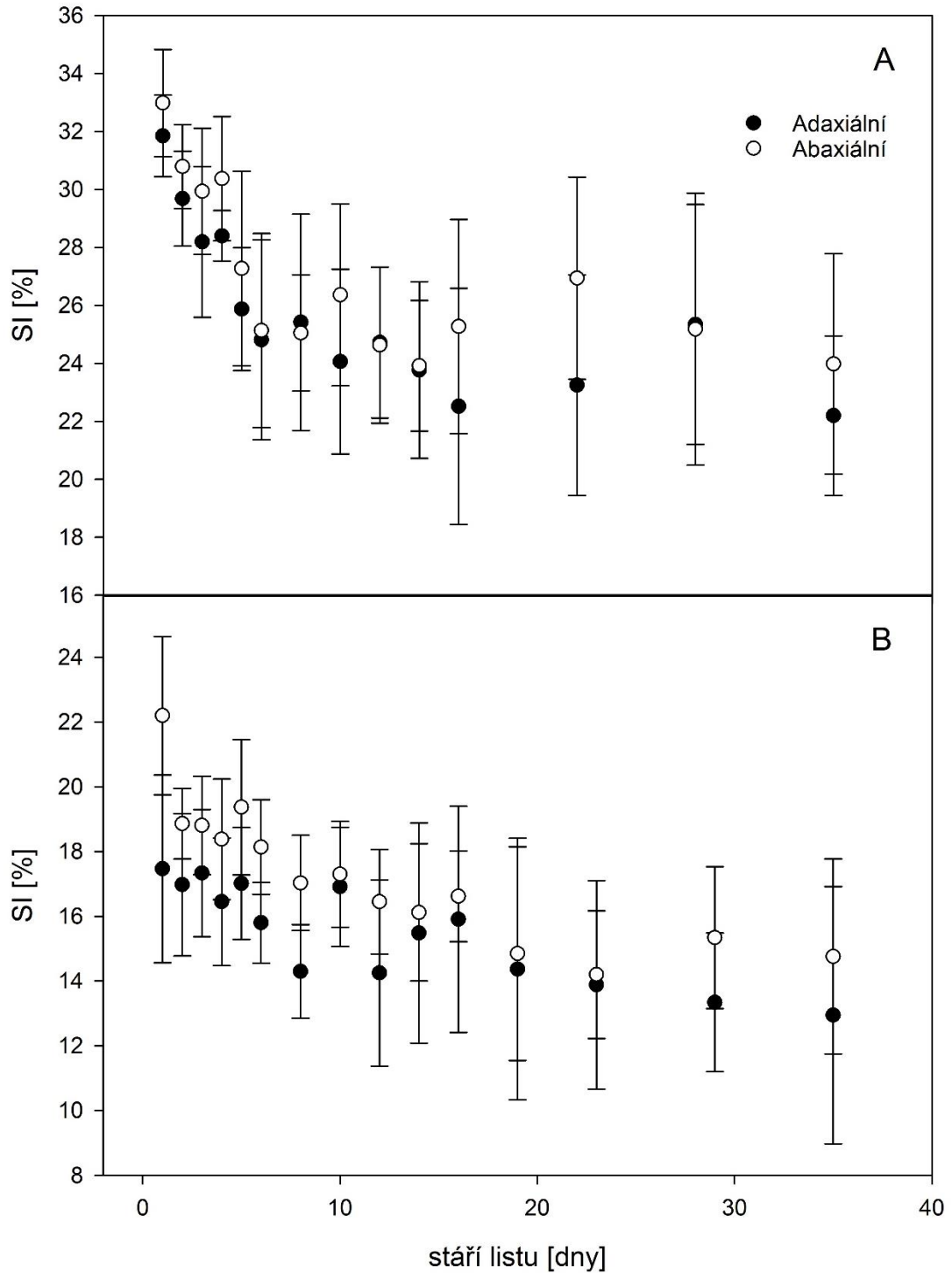


Obr. 4: Růst plochy prvních pravých listů v závislosti na stáří daného listu. A) u rostlin *Lepidium sativum*, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky plochy listu, dny 0-6 n=6, den 8-35 n=3. B) rostlin *Arabidopsis thaliana* v závislosti na stáří daného listu, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky plochy listu, n=6.



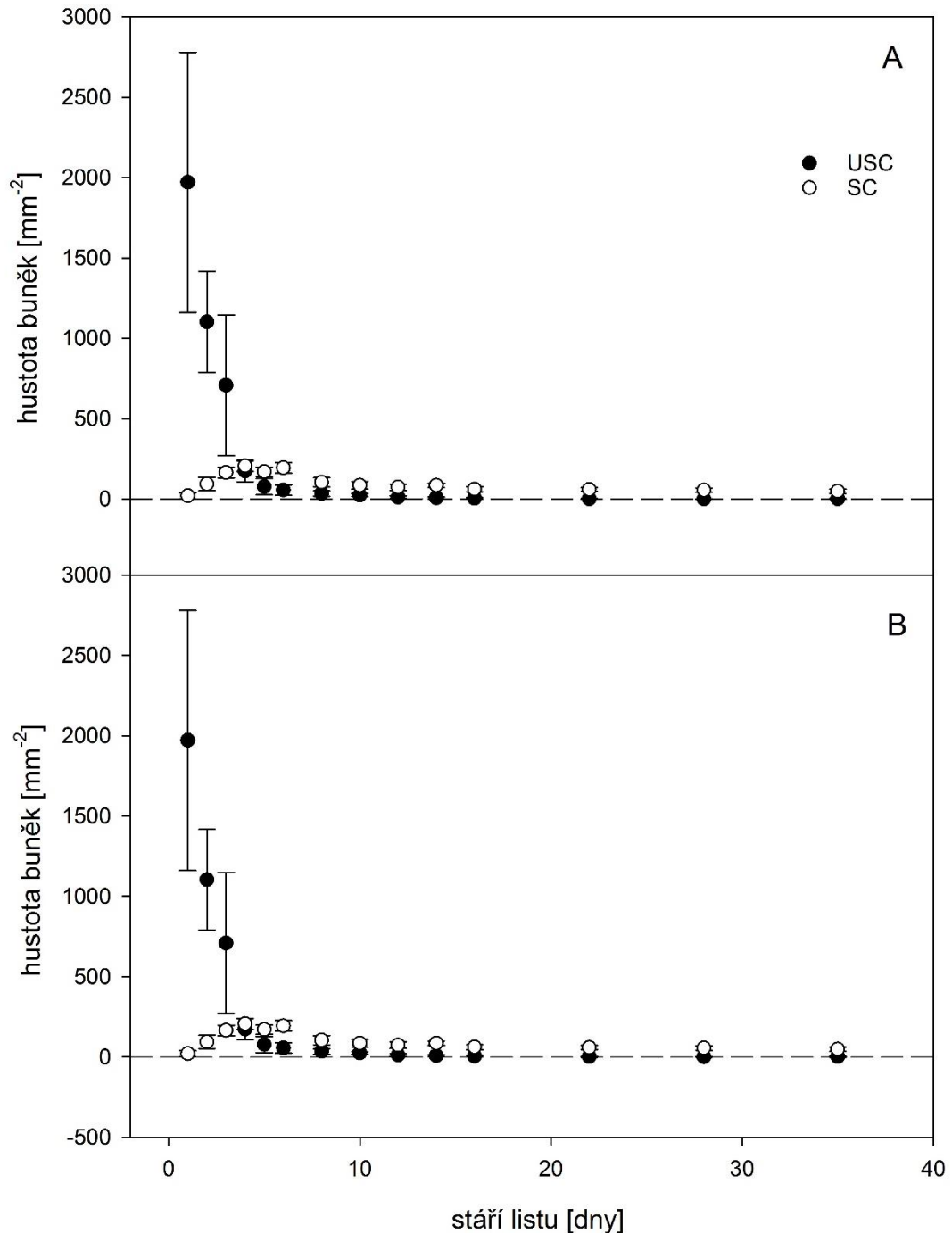
Obr. 5: Graf závislosti hustoty buněk [mm⁻²] na stáří prvních pravých listů A) adaxiální strana listu u *Lepidium sativum*, B) abaxiální strana *L. sativum*, C) adaxiální strana *Arabidopsis thaliana*, D) abaxiální strana *A. thaliana*. Zkratky USC (*undeveloped stomatal cells* – nevyvinuté průduchové buňky), SC (*stomatal cells* – průduchové buňky) a PVC (*pavement cells* – dlaždicové buňky) udávají typ buněk pro které je hustota znázorněna. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, n=3.

Buněk průduchové linie, tedy buněk USC (M + GMC) a SC buněk, vzniká v poměru ke všem epidermálním buňkám (USC, SC, PVC) nejvíce na začátku vývoje listů, což ukazuje SI. Hodnoty SI u *L. sativum* (**Obr. 6**) jsou lehce vyšší než u *A. thaliana*. V obou případech jsou hodnoty SI na abaxiální straně mírně vyšší než hodnoty z adaxiální strany listu.

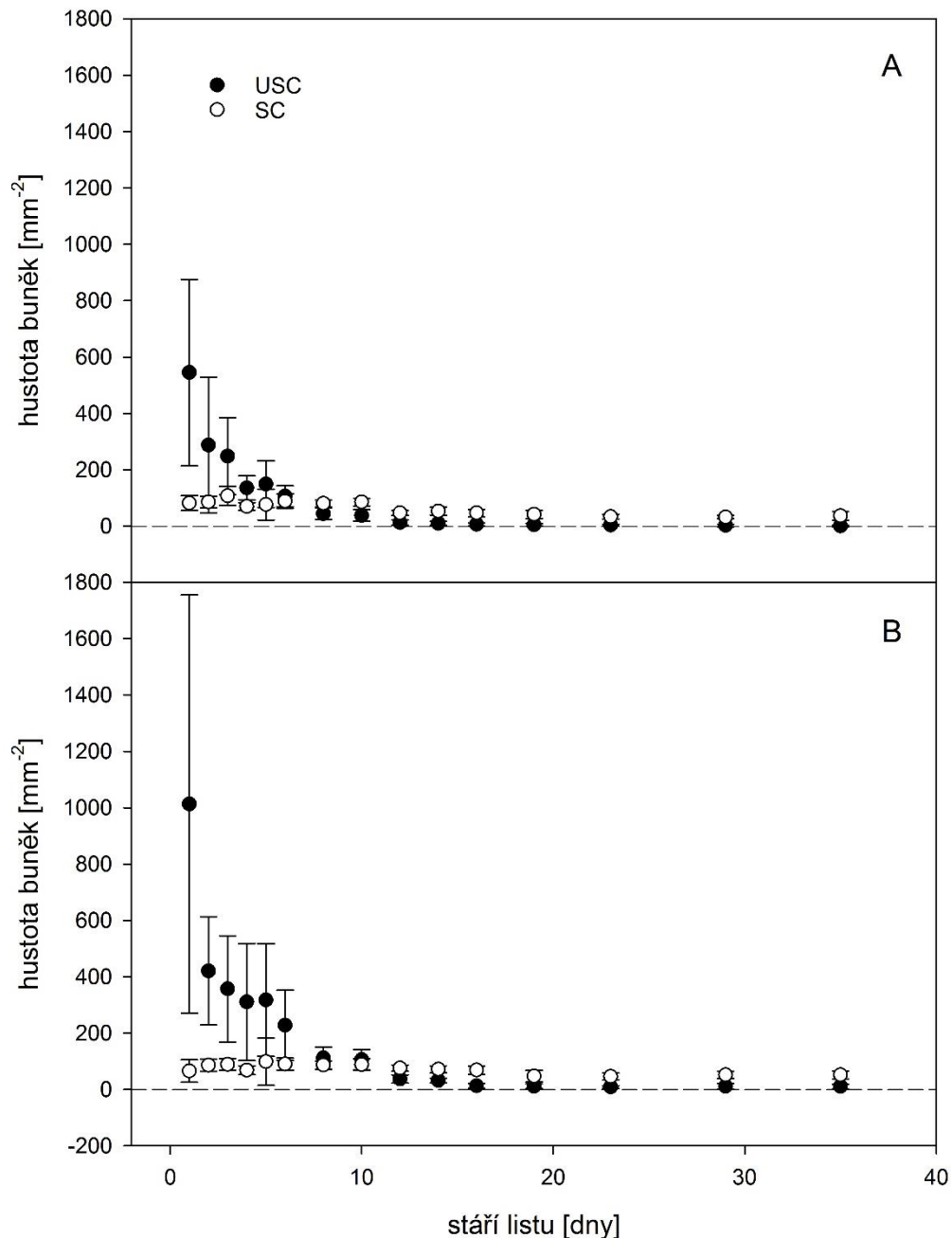


Obr. 6: Závislost průduchového indexu (SI) na stáří listu pro adaxiální a abaxiální stranu listu A) u *Lepidium sativum*, B) u *Arabidopsis thaliana*. Chybové úsečky znázorňují standardní odchylky SI, n=3.

U *L. sativum* 4. den překonala SD hustotu USC na adaxiální i abaxiální straně (detailněji zobrazeno **Obr. 7**), což znamená, že od čtvrtého dne vznikalo více SC než nově vyvíjejících se USC, jejichž počet začal klesat. Oproti tomu u *A. thaliana* překonala SD hustotu USC na adaxiální straně 8. den a na abaxiální straně až 12. den (detailněji zobrazeno **Obr. 8**).

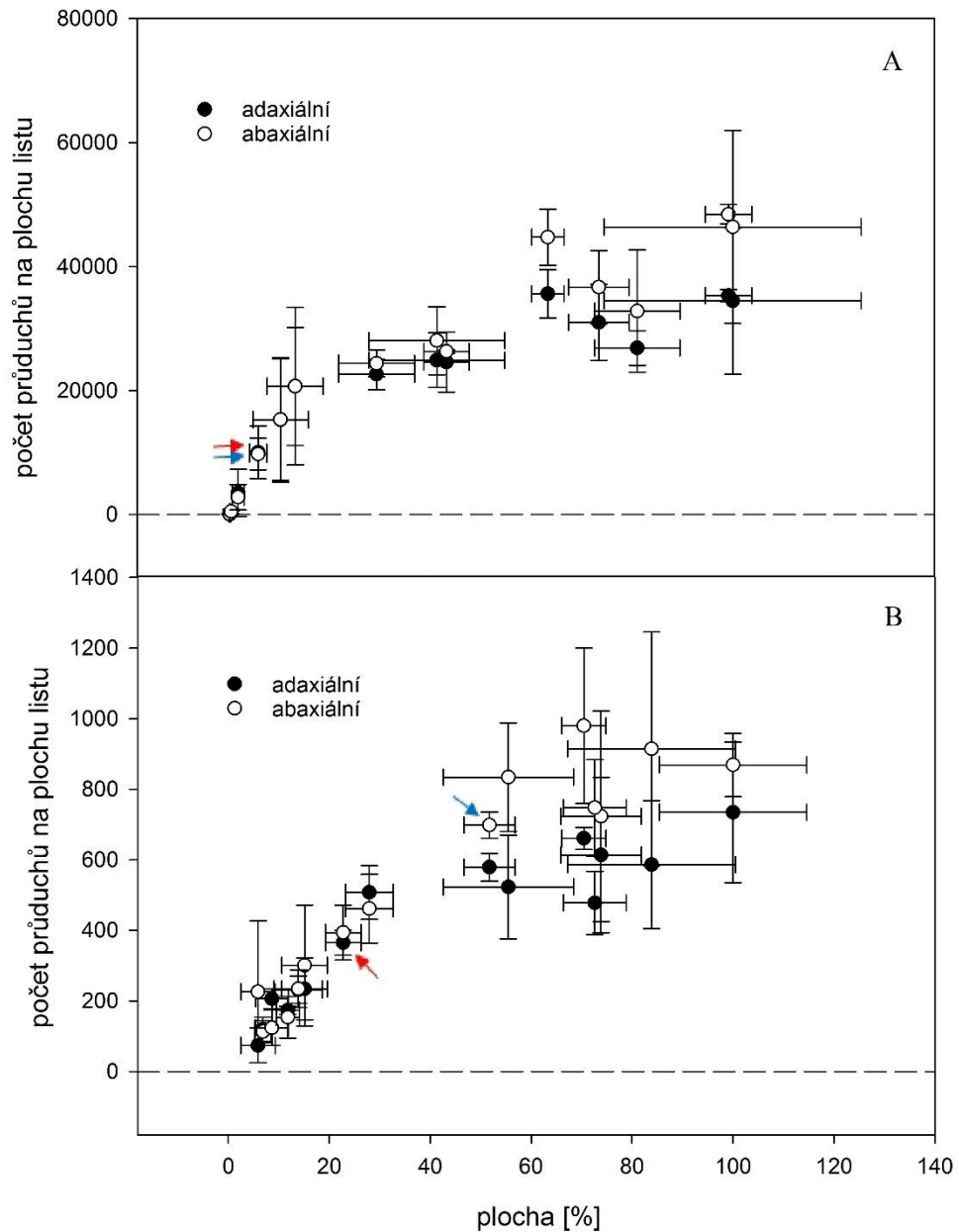


Obr. 7: Graf závislosti hustoty nevyvinutých průduchových (USC) a průduchových buněk (SC) na stáří prvních pravých listů u *Lepidium sativum* A) na adaxiální straně listu, B) na abaxiální straně. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, n=3.



Obr. 8: Graf závislosti hustoty nevyvinutých průduchových (USC) a průduchových buněk (SC) na stáří prvních pravých listů u *Arabidopsis thaliana* A) na adaxiální straně, B) na abaxiální straně listu. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, n=3.

Následující graf (**Obr. 9**) ukazuje, že u *L. sativum* byla už při 6% ploše založena většina průduchů (den kdy SD bylo poprvé vyšší než hustota USC) na obou stranách listů a při 63% konečné plochy byly na listech již všechny průduchy vyvinuty. U *A. thaliana* byla většina průduchů založena při 22% plochy na adaxiální straně a při 54% plochy na abaxiální straně listů, všechny průduchy byly na abaxiální straně vyvinuté při 30% plochy a na adaxiální straně až při 55% plochy.

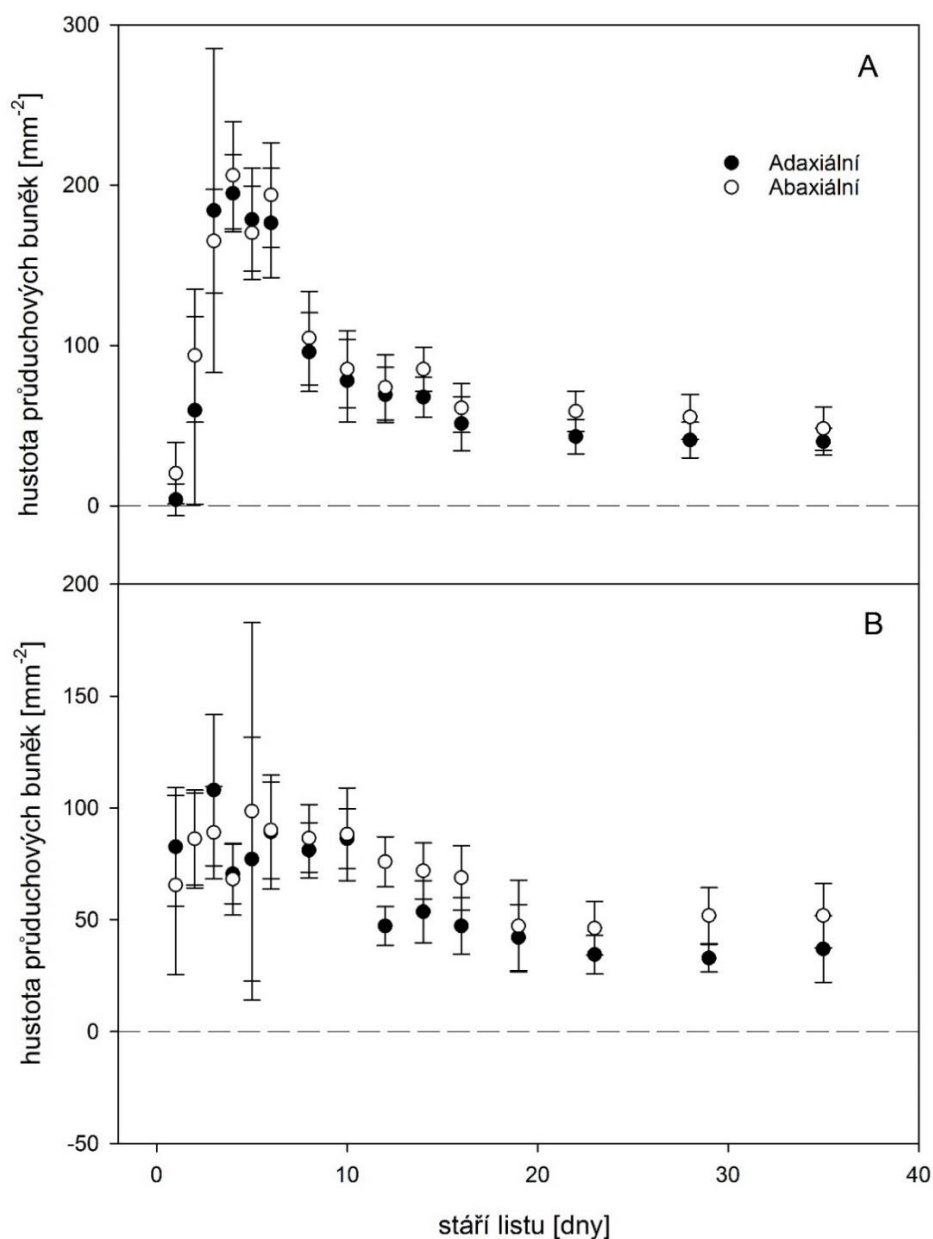


Obr. 9: Závislost počtu průduchů na plochu prvních pravých listů na adaxiální a abaxiální straně listů A) *Lepidium sativum* a B) *Arabidopsis thaliana*. Červená šipka pro adaxiální a modrá šipka pro abaxiální stranu listů ukazují okamžik, kdy byl počet průduchů (SC) vyšší než počet nevyvinutých průduchových buněk (USC). Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, n=3.

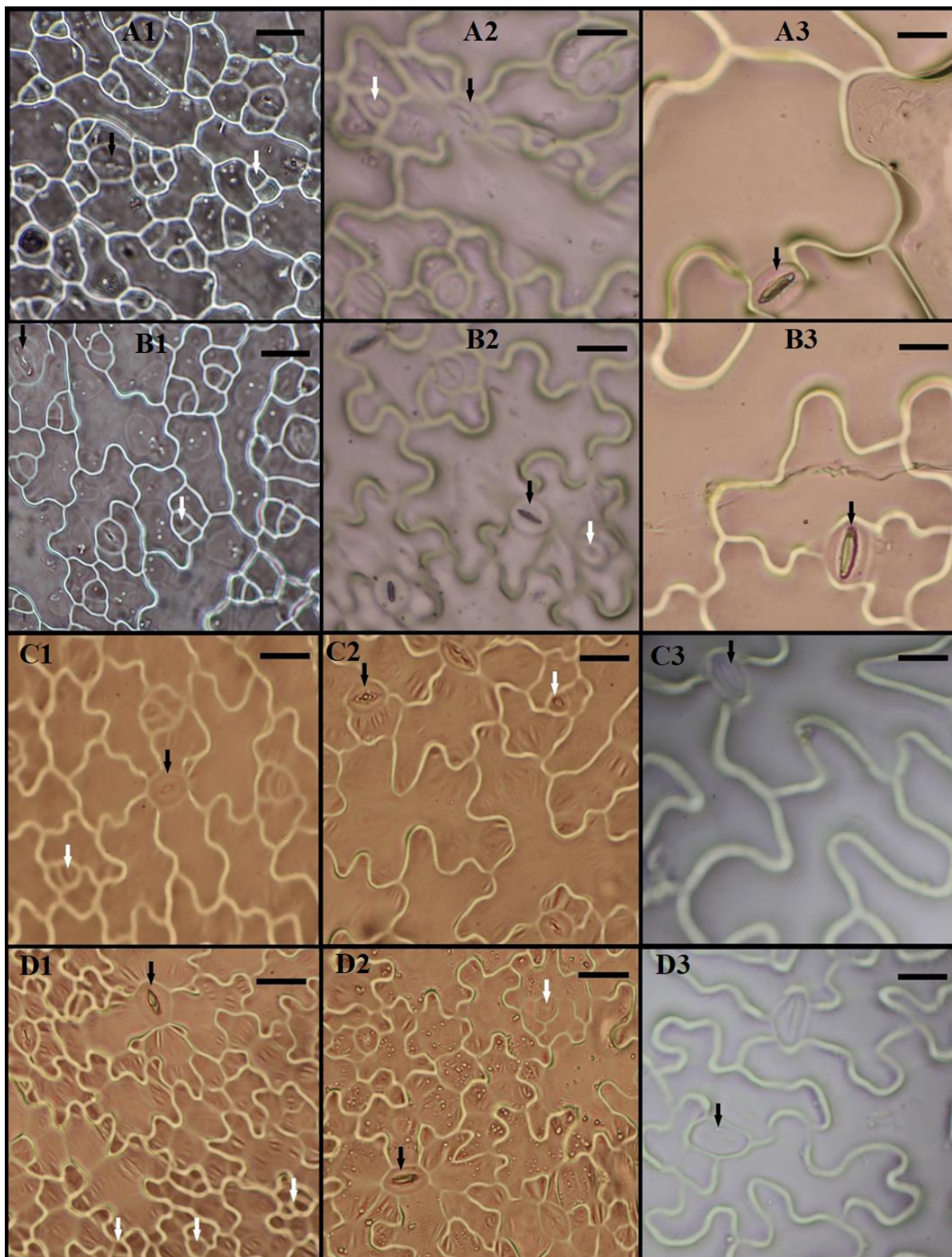
Porovnání vývoje průduchů na adaxiální a abaxiální straně ukazuje následující graf (**Obr. 10**). U *L. sativum* došlo k ustálení SD na adaxiální i abaxiální straně listu 16 dní po založení listů, nejvyšší SD bylo na obou stranách listů 4. den od založení listů. Při porovnání SI (**Obr. 6**) s SD je zajímavé, že SI abaxiální strany listů *L. sativum* přestalo klesat již od 6. dne a hodnoty SI dále oscilovali kolem hodnoty 6. dnu až do konce měření. U hodnot SI

z adaxiální strany listů *L. sativum* jsem zaznamenala až do 16. dne pokles SI, a poté oscilaci kolem hodnoty 16. dne.

Oproti SD u rostlin *L. sativum* se SD u rostlin *A. thaliana* ustálilo na abaxiální straně listů až 19. den a na adaxiální straně listů až 23. den (**Obr. 10**). Nejvyšší SD jsem na adaxiální straně zaznamenala u *A. thaliana* už 3. den, kdežto na abaxiální straně až 5. den. Zatímco hodnoty SI u *A. thaliana* mírně klesaly na adaxiální straně až do konce měření, tedy do 35. dne, na abaxiální straně klesaly do 23. dne a poté okolo této hodnoty oscilovaly (**Obr. 6**). Obě rostliny vykazují na abaxiální straně lehce vyšší počty průduchů (SD) i SI než na adaxiální straně.



Obr. 10: Porovnání hustoty průduchových buněk na stáří prvních pravých listů mezi adaxiální a abaxiální stranou listů A) *Lepidium sativum* a B) *Arabidopsis thaliana*. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, n=3.

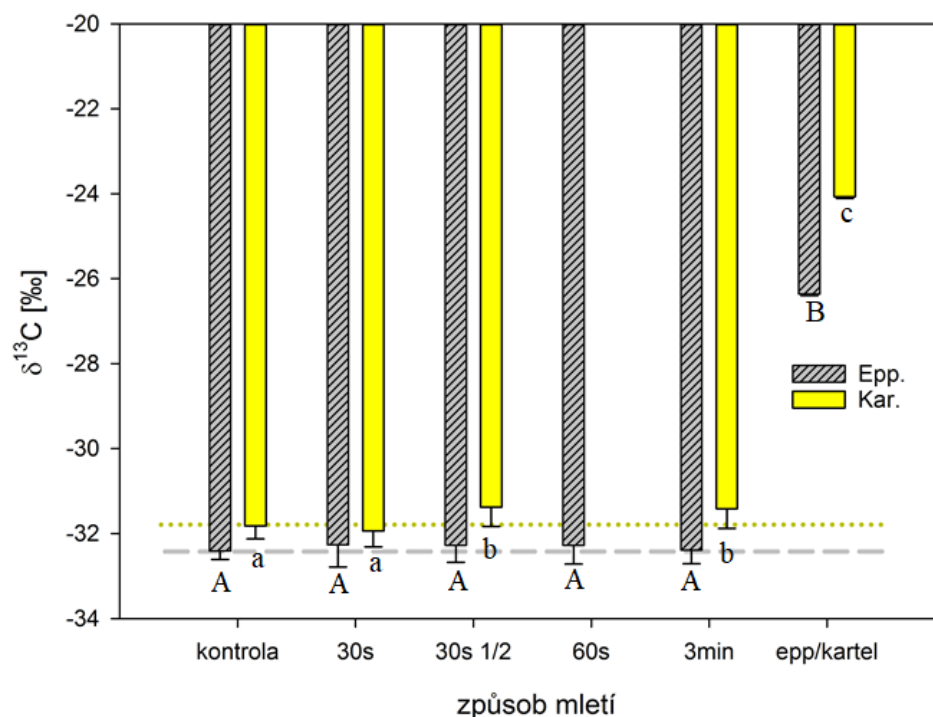


Obr. 11: Postupný vývoj buněk epidermis rostlin. Černé šipky ukazují na příklady vyvinutých průduchů (SC), bílé šipky ukazují příklady nedovyvinutých průduchů (USC). Číslice 1 značí u všech fotografií stáří prvních pravých listů 2 dny, číslice 2 značí 8 dní a číslice 3 značí 35 dní. Otisky A a B jsou nafoceny z pokožky *L. sativum*, písmeno A značí adaxiální a B abaxiální stranu listů. Otisky C a D jsou z pokožky *A. thaliana*, písmeno C značí adaxiální a D abaxiální stranu listů. Měřítko je u všech fotografií 0,02 mm.

5.2 Izotopová analýza

Pro správné vyhodnocení způsobu přípravy vzorků na izotopové analýzy bez hrozby kontaminace bylo potřeba ověřit izotopovou homogenitu vzorků mezi listy a v rámci jednotlivých výřezů listů. Listy byly ručně mlety v achátové třecí misce. Izotopové signály $\delta^{13}\text{C}$ vzorků z různých listů se mezi sebou sice lišily (jednocestná ANOVA, $p=0,0006$), nicméně izotopový signál $\delta^{13}\text{C}$ v rámci jednotlivých výřezů ze stejného listu (**Obr. 3**) homogenní byl (jednocestná ANOVA, $p=0,94$).

Při vyhodnocování způsobu přípravy vzorků na izotopové analýzy bez hrozby kontaminace byly porovnány izotopové signály $\delta^{13}\text{C}$ u vzorků mletých v polypropylenových mikrozkuřavkách vyráběných dvěma různými výrobci – Eppendorf a Kartel - při různých dobách mletí (**Obr. 3**, **Tab. 5**). Jednotlivé izotopové signály byly vyneseny do grafu (**Obr. 12**).

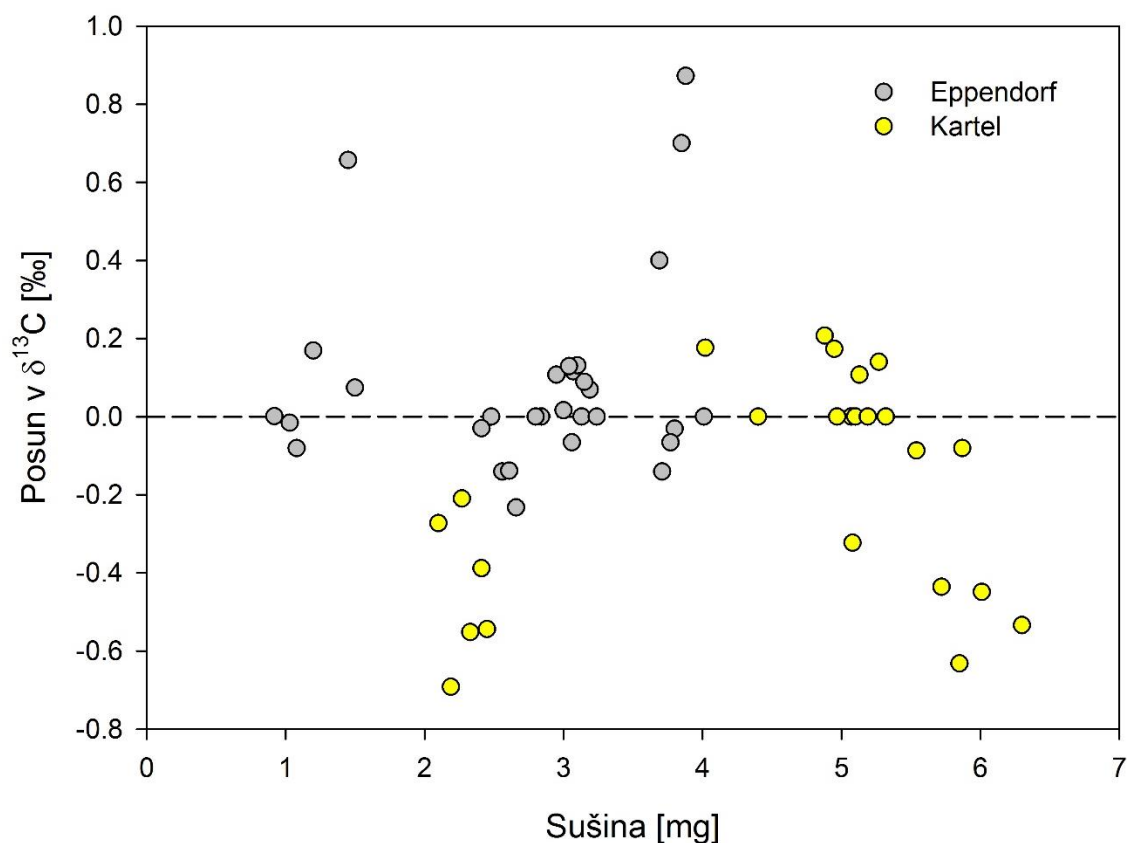


Obr. 12: Porovnání $\delta^{13}\text{C}$ v závislosti na použité mikrozkuřavce Epp. (Eppendorf), Kar. (Kartel) a použitém způsobu mletí. Na ose x jsou uvedeny doby mletí, “kontrola“ značí vzorky mleté ručně v třecí misce, “1/2“ značí menší plochu použitého terčiku a “epp/kartel“ udává izotopový signál čisté mikrozkuřavky. Písmena označují statisticky významné ($p < 0,05$) rozdíly mezi jednotlivými způsoby mletí. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, $n=6$.

Kvůli vyrovnání (vynulování vlivu rozdílů mezi listy na výsledné vyhodnocení) rozdílů mezi jednotlivými listy byl před statistickým vyhodnocením spočten posun $\delta^{13}\text{C}$ tak, že každý izotopový signál $\delta^{13}\text{C}$ byl odečten od izotopového signálu příslušné kontroly (mleto

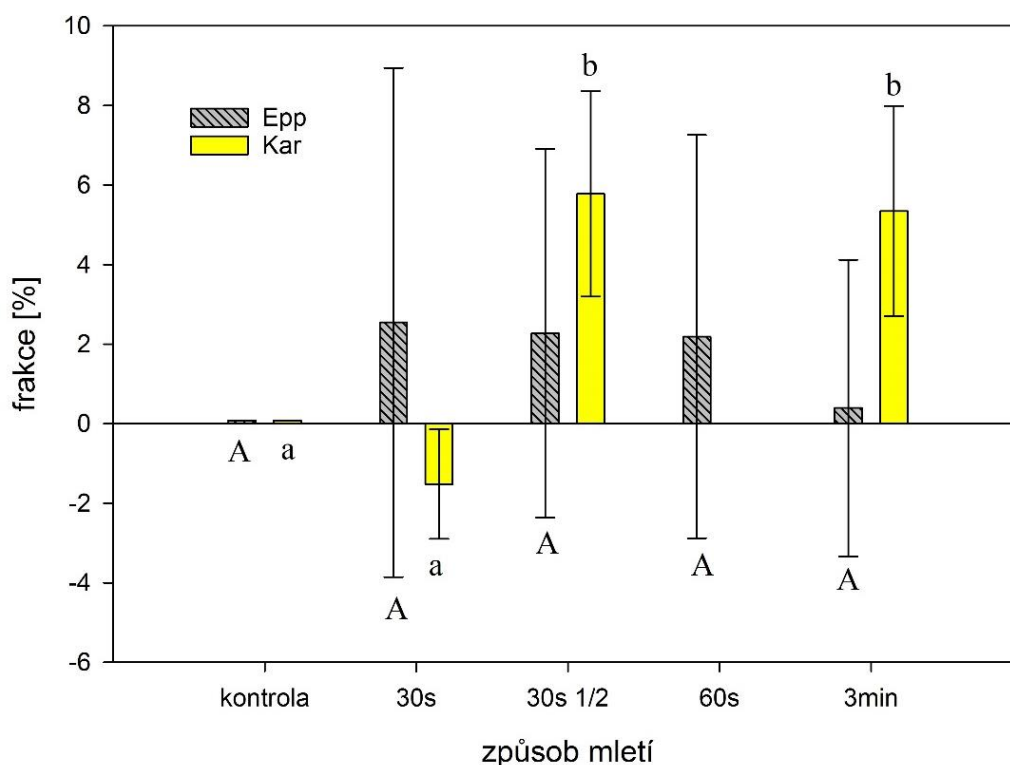
ručně v třetí misce). Izotopový signál $\delta^{13}\text{C}$ byl průkazně ovlivněn dobou mletí vzorku (dvoucestná ANOVA, se stupni volnosti 3, 40; $p=0,000013$) a kombinací doby mletí s použitou mikrozkuvkou (dvoucestná ANOVA, se stupni volnosti 3, 40; $p=0,0013$). Post-hoc Tukeyův test ukázal průkazné ovlivnění výsledného izotopového signálu ($p<0,05$) u mletí v mikrozkuvkách typu Kartel (**Obr. 12**).

Následující graf (**Obr. 13**) ukazuje, že hodnoty posunu $\delta^{13}\text{C}$ vzorků mletých v mikrozkuvkách Kartel se více blíží záporným hodnotám, což ukazuje na kontaminaci izotopového signálu vzorku izotopovým signálem mikrozkuvek. Oproti tomu hodnoty posunu $\delta^{13}\text{C}$ vzorků mletých v mikrozkuvkách Eppendorf, které mají vyšší garantovanou výdrž centrifugace, vykazují jen malý posun $\delta^{13}\text{C}$ od izotopového signálu kontroly. Kladné hodnoty mohou být způsobeny velikostí odchylky v rámci chyby měření. Graf (**Obr. 13**) také ukazuje, že mezi hmotností sušiny terčků (mg) (**Tab. 4**) a posunem izotopového signálu vzorku není viditelná závislost, odlišnosti hmotností sušiny tedy byly dostatečně malé a neovlivňovali výsledný izotopový signál vzorků.



Obr. 13: Vliv hmotnosti sušiny terčků (mg) na posun $\delta^{13}\text{C}$ vzorků ovlivněných mletím v odlišných mikrozkuvkách Referenční osa ukazuje hodnoty kontroly, $n=6$.

Zhodnocení, zda a jak moc se izotopový signál $\delta^{13}\text{C}$ blíží kontrole (ručně mletý v třecí misce) či izotopovému signálu mikrozkuřavky bylo prováděno z příslušných vypočtených frakcí. Výsledná frakce izotopového signálu $\delta^{13}\text{C}$ byla průkazně ovlivněna dobou mletí vzorku (dvoucestná ANOVA, $p=0,017$) a kombinací doby mletí s použitou mikrozkuřavkou (dvoucestná ANOVA, $p=0,01$). Post-hoc Tukeyův test ukázal průkazné ovlivnění výsledného izotopového signálu ($p<0,05$) u mletí v mikrozkuřavkách značky Kartel, konkrétně při mletí vzorku c (terčik $9,61\text{ cm}^2$, mletý 3 min) a vzorku d (terčik $3,8\text{ cm}^2$, mletý 30 s). Pro názornost byl z hodnot vytvořen graf, do kterého byly zaznamenány statistické rozdíly mezi jednotlivými způsoby mletí (Obr. 14). Oproti tomu při mletí vzorků v mikrozkuřavkách značky Eppendorf neukázal post-hoc Tukeyův test žádné průkazné ovlivnění výsledného izotopového signálu ($p<0,05$).



Obr. 14: Porovnání frakce [%] izotopového složení vzorku pocházející z kontaminace mikrozkuřavkou v závislosti na použité značce mikrozkuřavky (Eppendorf – Epp, Kartel – Kar) a použitým způsobu mletí. Na ose x jsou uvedeny doby mletí, “1/2“ značí menší plochu použitého terčiku a “kontrola“ značí vzorky mleté ručně v třecí misce. Písmena označují statisticky významné rozdíly ($p<0,05$) mezi jednotlivými způsoby mletí. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, $n=6$.

Narušení a oděr stěn mikrozkuřavek mletím bylo viditelné u mikrozkuřavek Kartel, které mají menší garantovanou výdrž centrifugace. Nejvíce bylo poškození viditelné po mletí menších vzorků. U mikrozkuřavek Eppendorf nebylo zaznamenáno viditelné poškození po žádném z porovnávaných způsobů mletí. Porovnání mikrozkuřavek Eppendorf a Kartel

po mletí menších vzorků (plocha terčíku 3,8 cm²) je vyfoceno na následujícím obrázku (Obr. 15).



Obr. 15: Porovnání poškození mikrozkuvek Eppendorf (bezbarvé) a Kartel (žluté) po mletí menších vzorků (plocha terčíku 3,8 cm²). Před vyfocením spodních obrázků byly mikrozkuvky pro lepší viditelnost vymyty.

6 Diskuze

6.1 Vliv stárnutí listu na SD, SI a plochu listu

Při stárnutí a vývoji listu se do určité doby zvětšuje jeho plocha a tvoří a zvětšují se buňky pokožky listu. U každé rostliny trvá různě dlouho dospívání listu do fáze, kdy se plocha listu již nezvětšuje, nové pokožkové buňky se netvoří a již vytvořené buňky už se nezvětšují. Je důležité před používáním dané rostliny pro další výzkum týkající se vývoje pokožky listů a mutací ovlivňujících vývoj, poznat dynamiku vývoje listů.

V této práci jsem pracovala s rostlinami *Arabidopsis thaliana* a *Lepidium sativum*. Oba druhy jsou běžně dostupné a relativně rychle rostoucí rostliny. Rostliny *L. sativum* byly

pro tuto práci výhodné tím, že na listech nemají žádné trichomy, které leckdy ztěžují odebrání otisků pokožky z listů a následné počítání epidermálních buněk. *A. thaliana* trichomy na listech má ale je to důležitá modelová rostlina, na které byly a jsou zkoumány různé mechanismy molekulární genetiky a fyziologie rostlin, jako například vlivy vnějšího prostředí na vývoj celých rostlin i jejich jednotlivých částí. Vliv stárnutí listů na jejich plochu, SI a SD jsem zkoumala na prvních pravých listech těchto rostlin. U *L. sativum* se první pravé listy objevily již po šesti dnech od zasazení semen, u *A. thaliana* po dvanácti dnech. Plocha listů rostla v prvních dnech pozvolna a poté až do ustálení strměji. U *L. sativum* nejstrměji rostla mezi 6. a 16. dnem, poté se růst mírně zpomalil a po 22. dnu se plocha víceméně ustálila. U *A. thaliana* rostla plocha listu nejstrměji mezi 8. a 23. dnem a poté růst ustával. U obou druhů rostlin došlo po dosažení největší plochy listu k mírnému kolísání či poklesu plochy což mohlo být zapříčiněno malým množstvím odběrů (v těchto pozdějších fázích vychází průměr listové plochy u *L. sativum* ze tří odebraných listů a u *A. thaliana* ze šesti) a variabilitou listů, tomu nasvědčují relativně velké směrodatné odchylky (**Obr. 4**). Variabilita listů mohla být ovlivněna environmentálními podmínkami například nehomogenním zářením či nestejnou vlhkostí zeminy. Květináče s rostlinami stáli vedle sebe u zdi, jejíž stín se během dne posouval se sluncem, a tedy v daný okamžik nestínil vždy všechny rostliny a zemina na přímém slunečním záření vysychala více (**Obr. P2**).

Jak již bylo zmíněno, během vývoje se tvoří nové a zvětšují staré epidermální buňky. U každého druhu rostliny trvá dosažení celkového počtu a konečné velikosti buněk různě dlouho a liší se v rámci rostliny mezi adaxiální a abaxiální stranou listu a mezi jednotlivými rostlinami daného druhu. Při porovnání listů mezi jedinci je vidět, že na začátku vývoje listu jsou počty buněk výrazně variabilnější což ukazují velké směrodatné odchylky (**Obr. 5**). U *L. sativum* se vysoké směrodatné odchylky počtu buněk snížily po třech dnech od prvního odběru, a tedy variabilita mezi listy v počtu buněk daného typu nebyla již tak veliká. Oproti tomu u *A. thaliana* jsem zaznamenala vysoké směrodatné odchylky po delší dobu zejména na abaxiální straně listů. Tato variabilita mohla být částečně způsobena rozdílným stářím listů v rozmezí hodin, protože rostliny jistě nevyklíčily ve stejný čas a poté nezačali ve stejný čas tvořit první pravé listy. Částečně také mohla být ovlivněna tím, že jsem neprováděla odběry listů vždy ve stejný určitý čas a lišili se v rozmezí půl hodiny až tří hodin. U starších listů odlišnost stáří v řádu hodin nehrála takovou roli, protože tvořila časově menší procento v životě listu. Proto je dobré při porovnávání a zkoumání vývoje epidermis rostlin počítáním SD a SI používat starší listy a odlišovat adaxiální a abaxiální stranu listů. Důležitostí odlišování adaxiální a abaxiální strany listu pro zkoumání a porovnávání SD a SI také

podporuje například studie zabývající se *tmm* mutanty u rostlin *Arabidopsis thaliana* (Hronková et al., 2015). Mutace v genu *TMM* obecně zvyšuje SD na listech rostlin, ale při odlišení stran bylo na adaxiální straně zaznamenáno mírné snížení SD oproti divokému typu rostlin a na abaxiální straně listů průkazné zvýšení SD oproti divokému typu rostlin.

Při porovnání různých prací zabývajících se studiem mutantů ve vývoji epidermis listu a faktorů ovlivňujících vývoj epidermis listu, mě proto překvapilo, že ne vždy je stáří listů odebíraných pro počítání SD a SI uváděno (Geisler and Sack 2002). A docela velká část prací uvádí a porovnává SD a SI jen pro abaxiální stranu listů (Engineer et al. 2016; Gray et al. 2000; Kanaoka et al. 2008) Ačkoli je trend shlukování průduchů či rozdílnost SD a SI způsobený mutací vývoje epidermis patrný i u listů mladších, je pozorování efektu způsobeného poruchou vývoje epidermis u starších listů patrnější a prokazatelnější díky, již zmiňované, menší variabilitě mezi staršími listy. Geisler a Sack (2002), kteří zkoumali vývoj epidermis na děložních listech *Arabidopsis thaliana*, uvádějí, že věk listů je sekundárním indikátorem počtu průduchových buněk na listu, zejména u adaxiální strany listu. Jako nejlepší indikátor počtu průduchů na listu zmiňují počet všech buněk listu, zejména pro abaxiální stranu listu. Korelace počtu všech buněk listu a počtu průduchových buněk na adaxiální straně je nižší.

V grafech obě rostliny vykazují na abaxiální straně mírně vyšší počty průduchů, než na adaxiální straně (**Obr. 10**) což souhlasí s tím, co ve své studii uvádí Geisler a Sack (2002), kteří zkoumali děložní listy huseníčku. Podle jejich výsledků bylo tvoření prekurzorů průduchů ukončeno dříve na adaxiální než abaxiální straně listu a tím vzniklo na adaxiální straně listu méně buněk než abaxiální straně. Výsledkem toho byly dlaždicovité buňky na adaxiální straně děložních listů větší než na abaxiální. V mých výsledcích jsem nezaznamenala dřívější ukončení tvoření prekurzorů průduchů na adaxiální straně listů. Ale shodně s jejich výsledky jsem zaznamenala větší velikost dlaždicovitých buněk na adaxiální straně prvních pravých listů *L. sativum* i *A. thaliana*, a to především u starších listů (**Obr. 11**). Tato shoda může poukazovat na to, že tyto mechanismy jsou obecné a fungují v rámci všech listů rostlin.

6.2 Izotopová analýza

Izotopové analýzy jsou v laboratořích Katedry experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty při Jihočeské univerzitě hojně využívány k indikaci podmínek vývoje průduchů, především jako indikátor koncentrace CO₂ v listu. Tento pokus jsem

prováděla na základě obavy, že mletím rostlinných vzorků na kulovém mlýnu při přípravě pro izotopové analýzy, může docházet ke kontaminaci vzorku materiálem ze stěn mikrozkuavek, ve kterých jsou vzorky mlety, a tím k ovlivnění izotopového signálu $\delta^{13}\text{C}$. Porovnávala jsem různé doby mletí, různé množství mletých vzorků a použila jsem dvě odlišné mikrozkuavky od různých výrobců. Tento problém byl již dříve zkoumán pro mletí vzorků dřeva, které ale potřebuje delší doby mletí, což mohlo způsobit větší poškození mlecích nádobek a ovlivnění výsledného izotopového signálu. Ovlivnění $\delta^{13}\text{C}$ izotopových signálů vzorků izotopovým signálem nádobek, ve kterých byly vzorky mlety, prokázali Isaac-Renton, Schneider a Treydte (Isaac-Renton et al. 2016) (2016), kteří mleli vzorky dřeva z *Picea abies* (smrk ztepilý) v množství 10 mg a 40 mg po dobu 5 a 10 minut. Průkazné ovlivnění bylo prokázáno pro mletí menšího množství (10 mg) a delší mletí (10 min). Oproti tomu Riechelmann a spol. (2014), kteří mleli vzorky o objemu 5 cm^3 z dřeva *Abies concolor* (jedle stejnobarvá) po dobu 3,5 and 8 minut neprokázali žádné ovlivnění $\delta^{13}\text{C}$ izotopového signálu vzorků. Pro mé vyhodnocení různých způsobů přípravy vzorků pro izotopové analýzy $\delta^{13}\text{C}$ jsem používala rostliny *Nicotiana tabacum*.

Rostliny *N. tabacum* jsou často využívány jako modelové rostliny a podobně jako *A. thaliana* a *L. sativum* rostou poměrně rychle. Ale oproti *A. thaliana* a *L. sativum* vytvoří podstatně více biomasy, což bylo výhodné pro vyhodnocení ovlivnění izotopových analýz zapříčiněných různými způsoby přípravy vzorku v rámci jednoho listu. Porovnávala jsem izotopové signály $\delta^{13}\text{C}$ u vzorků mletých v různém množství (**Tab. 4, Obr. 3**), různě dlouho (30s, 60s a 3 min) v mikrozkuavkách dvou rozdílných značek s odlišnou garantovanou výdrží centrifugace - Eppendorf (25000*g) a Kartel (11000*g).

Před porovnáváním přípravy vzorků různými variantami mletí jsem ověřovala homogenitu izotopového signálu mezi listy a v rámci listů. Jistou malou, ale statisticky nevýraznou variabilitu izotopového signálu mezi listy jsem zaznamenala. Distribuce ^{13}C v rámci listu byla homogenní.

Výsledky porovnání způsobů přípravy vzorků poukazují na to, že delší mletí a mletí menších množství vzorků v méně odolných mikrozkuavkách může zapříčinit ovlivnění výsledného $\delta^{13}\text{C}$ izotopového signálu. Při delším mletí dojde snadněji k většímu narušení mikrozkuavek, stejně jako při mletí menšího množství vzorku, kdy mlecí kuličky více naráží do stěn mikrozkuavky a častěji jí poškozují. Pro mletí menšího množství vzorku by měli stačit kratší doby mletí. Při menším množství vzorku se také zvyšuje riziko, že se v izotopovém signálu projeví menší znečištění, protože částičky odřené ze stěn mikrozkuavek mají vyšší procentuální zastoupení na množství vzorku než u větších

vzorků. U méně odolných mikrozkuavek je samozřejmě narušení jejich stěn jednodušší, což ukazuje **Obr. 15**. Míra posunu izotopového signálu závisí také na tom, jaký materiál se mele a jak je vzdálený jeho izotopový signál od izotopového signálu mlecí nádoby. U materiálů, které jsou blízké svým izotopovým signálem mlecí nádoby se kontaminace ve výsledném izotopovém signálu příliš neprojeví, naopak například u vzorků rostlin pulzně značených oxidem uhličitým s násobně vyšším obsahem uhlíku ^{13}C je rozdíl v hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ mezi mlecí nádobkou a vzorkem veliký a projeví se i malá kontaminace. Což lze názorně ukázat na teoretickém příkladu: jako $\delta^{13}\text{C}$ mikrozkuavky použijí naměřený izotopový signál mikrozkuavek Eppendorf, tedy -26‰ a pro frakci zvolím hodnotu 2‰ . Pokud by hodnota $\delta^{13}\text{C}$ rostlinného materiálu byla -31‰ , po mletí v mikrozkuavce bych naměřila hodnotu $-30,9\text{‰}$. Kdybych použila značené rostliny s hodnotou $\delta^{13}\text{C}$ 200‰ , po mletí v mikrozkuavce by byla výsledná hodnota $195,48\text{‰}$. Míra posunu signálu tedy závisí také na rozdílu v izotopovém složení obou materiálů.

Závěr

1. Vývoj průduchů je ovlivňován různými vnějšími i vnitřními faktory. Zejména aktuálními potřebami, stavem rostliny a environmentálními podmínkami, jako je světelné záření, dostupnost vody či koncentrace oxidu uhličitého v okolní atmosféře. Intenzivně je zkoumáno mnoho genů potřebných pro správný vývoj průduchů i okolních epidermálních buněk a efekt ve fyziologii, pokud dojde k jejich mutaci. Koordinace příjmu signálu, jeho přenosu a exprese pro nově se vyvíjející listy je zásadní pro přizpůsobení vývoje v reakci na environmentální faktory a jejich změny. Přes velké úsilí zatím není známo, který z faktorů je pro výsledný vývoje klíčový, ani jakou podobu má přenášený signál.
- 2a. Ověřila jsem, že při odebírání otisků pokožky z listů je dobré pracovat se staršími listy, protože mezi počty epidermálních buněk u mladších listů je vyšší variabilita. Mezi rostlinami se doba snížení vysoké variability a ustálení počtu buněk (nejen průduchových SD, SI, také PVC, USC) liší, ale u obou zkoumaných druhů rostlin se stářím listů variabilita klesá. Variabilita se opětovně zvyšuje s nástupem stárnutí a sesychání listů. Doba ustálení a variabilita počtu buněk se také liší mezi adaxiální a abaxiální stranou listů, a proto je dobré strany listů odlišovat. Zaznamenaná plocha listů rostla zhruba do 22. dne od založení listů a poté se ustálila. S nástupem senescence, sesychání

a krabacení listů mírně poklesla. Každý druh rostlin se ale v závislosti na vnějších podmínkách vyvíjí různě dlouho, a proto je potřeba před používáním dané rostliny pro další výzkum týkající se vývoje pokožky listů a mutací ovlivňujících vývoj poznat dynamiku vývoje listů.

2b. Pro předcházení možnosti kontaminace při přípravě vzorků na izotopové analýzy ^{13}C je třeba mlít vzorky na kulovém mlýnu v dostatečně odolných mikrozkuřkách, zde se mi ověřily mikrozkuřky značky Eppendorf s garantovanou výdrží centrifugace 25000*g. Mlít vzorky po nejkratší potřebnou dobu, protože delším mletím může dojít k většímu poškození mlecí nádoby což a výraznějšímu ovlivnění výsledného izotopového signálu. Také doporučuji mlít dostatečně velké množství vzorku, jelikož v menším množství namleté hmoty se snadněji projeví i menší znečištění neboť tvoří větší část výsledné namleté hmoty. Vždy je ale lepší před používáním tohoto způsobu přípravy vzorků pro izotopové analýzy ověřit, zda ke kontaminaci nedochází. To lze například porovnáním $\delta^{13}\text{C}$ vzorků mletých na kulovém mlýnu se vzorky mletými v nádobě, která je z mechanicky odolného materiálu a neobsahuje ve své struktuře izotopy uhlíku (například achátová třecí miska, či kovová mlecí nádoba).

Literatura

- Ainsworth EA, Rogers A (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell Environ* 30: 258-270
- Bacastow R, Keeling CD (1973) Atmospheric Carbon-Dioxide and Radiocarbon in Natural Carbon Cycle.2. Changes from Ad 1700 to 2070 as Deduced from a Geochemical Model. *Brookhaven Sym Biol*: 86-135
- Berryman CA, Eamus D, Duff GA (1994) Stomatal Responses to a Range of Variables in 2 Tropical Tree Species Grown with CO₂, Enrichment. *J Exp Bot* 45: 539-546
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu DM (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760-765
- Casson SA, Franklin KA, Gray JE, Grierson CS, Whitelam GC, Hetherington AM (2009) Phytochrome B and PIF4 Regulate Stomatal Development in Response to Light Quantity. *Curr Biol* 19: 229-234
- Casson SA, Hetherington AM (2014) phytochrome B Is Required for Light-Mediated Systemic Control of Stomatal Development. *Curr Biol* 24: 1216-1221
- Ciais P, Denning AS, Tans PP, Berry JA, Randall DA, Collatz GJ, Sellers PJ, White JWC, Trolier M, Meijer HAJ, Francey RJ, Monfray P, Heimann M (1997) A three-dimensional synthesis study of delta O⁻¹⁸ in atmospheric CO₂ .1. Surface fluxes. *J Geophys Res-Atmos* 102: 5857-5872
- Croxdale JL (2000) Stomatal patterning in angiosperms. *Am J Bot* 87: 1069-1080
- Easlon HM, Bloom AJ (2013) The effects of rising atmospheric carbon dioxide on shoot-root nitrogen and water signaling. *Front Plant Sci* 4
- Edwards D (1993) Cells and Tissues in the Vegetative Sporophytes of Early Land Plants. *New Phytol* 125: 225-247
- Edwards D, Rose V (1984) Cuticles of *Nematothallus* - a Further Enigma. *Bot J Linn Soc* 88: 35-54
- Engineer CB, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Israelsson-Nordstrom M, Azoulay-Shemer T, Rappel WJ, Iba K, Schroeder JI (2016) CO₂ Sensing and CO₂ pecculation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions. *Trends Plant Sci* 21: 16-30
- Farber M, Attia Z, Weiss D (2016) Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato. *J Exp Bot* 67: 6351-6362

- Farquhar GD, Oleary MH, Berry JA (1982) On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Inter-Cellular Carbon-Dioxide Concentration in Leaves. *Aust J Plant Physiol* 9: 121-137
- Geisler M, Sack FD (2002) Variable timing of developmental progression in the stomatal pathway in *Arabidopsis* cotyledons. *New Phytol* 153: 469-476
- Glover B. J. (2007) *Handbook of Plant Science*. Roberts K (ed). Wiley, England, 1563 pp
- Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodward FI, Schuch W, Heterington AM (2000) The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* 408: 713-716
- Hara K, Kajita R, Torii KU, Bergmann DC, Kakimoto T (2007) The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Gene Dev* 21: 1720-1725
- Hara K, Yokoo T, Kajita R, Onishi T, Yahata S, Peterson KM, Torii KU, Kakimoto T (2009) Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Cell Physiol* 50: 1019-1031
- Hronková M, Wiesnerová D, Šimková M, Skůpa P, Dewitte W, Vráblová M, Zažímalová E, Šantrůček J (2015) Light-induced STOMAGEN-mediated stomatal development in *Arabidopsis* leaves. *J Exp Bot* 66: 4621-4630
- Isaac-Renton M, Schneider L, Treydte K (2016) Contamination risk of stable isotope samples during milling. *Rapid Commun Mass Sp* 30: 1513-1522
- Kanaoka MM, Pillitteri LJ, Fujii H, Yoshida Y, Bogenschutz NL, Takabayashi J, Zhu JK, Torii KU (2008) SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell* 20: 1775-1785
- Kang CY, Lian HL, Wang FF, Huang JR, Yang HQ (2009) Cryptochromes, Phytochromes, and COP1 Regulate Light-Controlled Stomatal Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2624-2641
- Kim TW, Michniewicz M, Bergmann DC, Wang ZY (2012) Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature* 482: 419-U1526
- Kondo T, Kajita R, Miyazaki A, Hokoyama M, Nakamura-Miura T, Mizuno S, Masuda Y, Irie K, Tanaka Y, Takada S, Kakimoto T, Sakagami Y (2010) Stomatal Density is Controlled by a Mesophyll-Derived Signaling Molecule. *Plant Cell Physiol* 51: 1-8
- Kumari A, Jewaria PK, Bergmann DC, Kakimoto T (2014) *Arabidopsis* Reduces Growth Under Osmotic Stress by Decreasing SPEECHLESS Protein. *Plant Cell Physiol* 55: 2037-2046

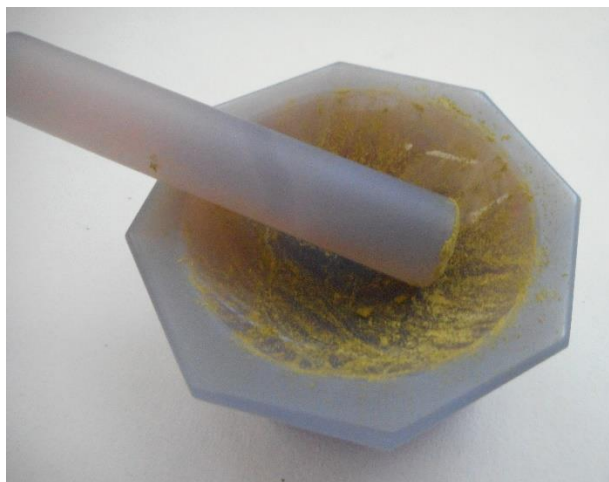
- Květoň J (2018) Stabilní izotopy - terminologie, analýzy, přírodní výskyt. In: Šantrůček J et al. Stabilní izotopy biogenních prvků. Použití v biologii a ekologii. Academia, Praha. Pp 21-39
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI (2001) Plant development - Signals from mature to new leaves. *Nature* 411: 154-154
- Larkin JC, Marks MD, Nadeau J, Sack F (1997) Epidermal cell fate and patterning in leaves. *Plant Cell* 9: 1109-1120
- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR (2009) Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *J Exp Bot* 60: 2859-2876
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: Plants face the future. *Annu Rev Plant Biol* 55: 591-628
- MacAlister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC (2007) Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* 445: 537-540
- Medlyn BE, Barton CVM, Broadmeadow MSJ, Ceulemans R, De Angelis P, Forstreuter M, Freeman M, Jackson SB, Kellomaki S, Laitat E, Rey A, Roberntz P, Sigurdsson BD, Strassmeyer J, Wang K, Curtis PS, Jarvis PG (2001) Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytol* 149: 247-264
- Nadeau JA, Sack FD (2002) Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science* 296: 1697-1700
- Neftel A, Moor E, Oeschger H, Stauffer B (1985) Evidence from Polar Ice Cores for the Increase in Atmospheric CO₂ in the Past 2 Centuries. *Nature* 315: 45-47
- Ohashi-Ito K, Bergmann DC (2006) Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell* 18: 2493-2505
- Park R, Epstein S (1961) Metabolic Fractionation of C¹³ and C¹² in Plants. *Plant Physiol* 36: 133-&
- Pillitteri LJ, Torii KU (2007) Breaking the silence: three bHLH proteins direct cell-fate decisions during stomatal development. *Bioessays* 29: 861-870
- Qi XY, Torii KU (2018) Hormonal and environmental signals guiding stomatal development. *Bmc Biol* 16
- Raven JA (2002) Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytol* 153: 371-386

- Robinson S, de Reuille PB, Chan J, Bergmann D, Prusinkiewicz P, Coen E (2011) Generation of Spatial Patterns Through Cell Polarity Switching. *Science* 333: 1436-1440
- Saibo NJM, Vriezen WH, Beemster GTS, Van Der Straeten D (2003) Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant J* 33: 989-1000
- Shpak ED, Berthiaume CT, Hill EJ, Torii KU (2004) Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development* 131: 1491-1501
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Phys* 52: 627-658
- Sugano SS, Shimada T, Imai Y, Okawa K, Tamai A, Mori M, Hara-Nishimura I (2010) Stomagen positively regulates stomatal density in *Arabidopsis*. *Nature* 463: 241-U130
- Sylvester AW, Smith L, Freeling M (1996) Acquisition of identity in the developing leaf. *Annu Rev Cell Dev Bi* 12: 257-304
- Šantrůček J (1998) Průduchy, mechanismus pohybu, jejich reakce na vnější podněty. In: Procházka S et al. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha. Pp 80-83
- Šantrůček J (2018) Izotopová frakcionace uhlíku. In: Šantrůček J et al. *Stabilní izotopy biogenních prvků. Použití v biologii a ekologii*. Academia, Praha. Pp 43-60
- Taitz L, Zeiger E (2002) Stress physiology. In: *Plant physiology*, 3rd ed. Sinauer Associates. Pp. 591-621
- Teng NJ, Jin B, Wang QL, Hao HQ, Ceulemans R, Kuang TY, Lin JX (2009) No Detectable Maternal Effects of Elevated CO₂ on *Arabidopsis thaliana* Over 15 Generations. *Plos One* 4
- Vaten A, Bergmann DC (2012) Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view. *Evodevo* 3
- Villagarcia H, Morin AC, Shpak ED, Khodakovskaya MV (2012) Modification of tomato growth by expression of truncated ERECTA protein from *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 63: 6493-6504
- von Groll U, Berger D, Altmann T (2002) The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell* 14: 1527-1539
- Vráblová M (2017) Regulation of stomatal development by environmental conditions and physiological processes in the leaf, Ph.D. Thesis Series, No. 16. University of South

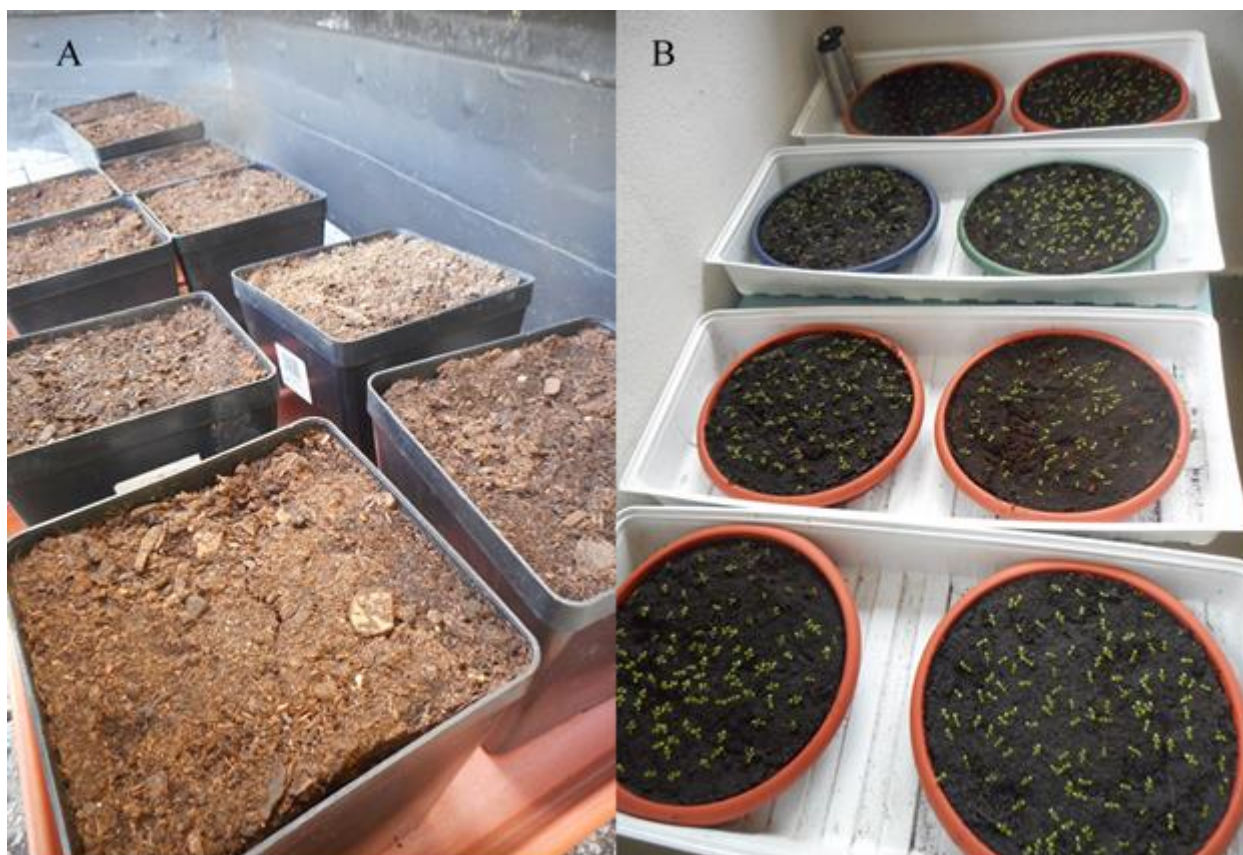
Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic, 131 pp.

- Woodward FI (1987) Stomatal Numbers Are Sensitive to Increases in CO₂ from Preindustrial Levels. *Nature* 327: 617-618
- Woodward FL, Kelly CK (1995) The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytol* 131: 311-327
- Xu Z, Zhou G (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J Exp Bot* 59: 3317-3325
- Yamaguchi N, Wu MF, Winter CM, Berns MC, Nole-Wilson S, Yamaguchi A, Coupland G, Krizek BA, Wagner D (2013) A Molecular Framework for Auxin-Mediated Initiation of Flower Primordia. *Dev Cell* 24: 271-282
- Yang M, Sack FD (1995) The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in arabidopsis. *Plant Cell* 7: 2227-2239
- Zoulas N, Harrison EL, Casson SA, Gray JE (2018) Molecular control of stomatal development. *Biochem J* 475: 441-454

Přílohy



Obr. P1: Používaná achátová třecí miska.



Obr. P2: Uspořádání květináčů při pěstování rostlin A) *L. sativum* a B) *A. thaliana*.