

Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Bakalářská diplomová práce



Srovnávací anatomie kořenů vybraných druhů masožravých rostlin

Vypracoval: Pavel Kohout
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Lubomír Adamec
Konzultant: Prof. RNDr. Karel Beneš, Csc.

České Budějovice

2002

Bakalářská diplomová práce

Kohout P. (2002): Srovnávací anatomie kořenů vybraných druhů masožravých rostlin. [Comparative anatomy of roots of selected species of carnivorous plants. Bc. Thesis, in Czech] – p.36, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation:

Carnivorous plants grow in mineral poor and wet soils, in which they often encounter anoxic conditions. It raises the question whether roots of carnivorous plants have some anatomical adaptations similar to wetland plants. In the present work, the anatomy of roots of 3 selected carnivorous species was studied with respect to adaptations to mineral malnutrition and anoxic and waterlogged soil and compared with the anatomical structure of roots of some wetland plants. The study was performed by the use of the paraffine technique and Alcian blue-Safranin staining of cross-sections of roots for highlighting its anatomical structure. The structure was photographed using classical “wet” photography and digital imaging with CCD camera.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.



V Českých Budějovicích, dne 22.05.2002

Pavel Kohout

Poděkování:

Chtěl bych zde poděkovat všem, kteří mi pomohli. Především pak RNDr. Lubomíru Adamcovi a Prof. RNDr. Karlu Benešovi, Csc. za všechnu jejich pomoc a odborné vedení a v průběhu celé mé práce a dále RNDr. Slavomíru Rakouskému, Csc. a Janě Jehlíkové za ochotné zpřístupnění laboratorní techniky, kterou jsem při své práci potřeboval.

OBSAH:

1. ÚVOD.....	1
2. MATERIÁL A METODIKA.....	3
2.1 ODBĚR MATERIÁLU.....	3
2.2 ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU.....	4
2.3 FOTOGRAFOVÁNÍ.....	6
3. VÝSLEDKY.....	7
3.1 BARVENÍ A FOTODOKUMENTACE.....	7
3.2 ANATOMICKÁ STAVBA PŘÍČNÝCH ŘEZŮ KOŘENŮ MR.....	8
3.2.1 ROSNATKA <i>DROSERA ADELAE</i>	8
3.2.2 MUCHOLAPKA <i>DIONAEA MUSCIPULA</i>	9
3.2.3 ŠPIRLICE <i>SARRACENIA RUBRA</i>	9
3.3 SHRNUÍ.....	11
4. DISKUSE.....	12
4.1 IDENTIFIKACE KOŘENE.....	12
4.2 PROBLEMATIKA BARVENÍ SEKUNDÁRNÍCH STĚN.....	12
4.3 SROVNÁNÍ FOTOGRAFICKÝCH TECHNIK.....	13
4.5 MASOŽRAVÉ VERSUS MOKŘADNÍ ROSLINY.....	13
5. ZÁVĚR.....	16
6. LITERATURA.....	17
7. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA.....	22

1. ÚVOD

Masožravé rostliny¹ představují zvláštní ekologickou skupinu rostlin. Na celém světě jich je přes 600 druhů z celkového počtu asi 300 000 druhů cévnatých rostlin. Rostliny, jež považujeme za masožravé, splňují tři kritéria: a) chytají nebo loví kořist, b) přijímají metabolity z kořisti, c) využívají tyto metabolity ke svému růstu a vývoji (Lloyd 1942). Většina pozemních MR roste na rašelinných a slatinných půdách, na nichž se trvale střetávají s nepříznivými podmínkami pro svůj růst. Tyto půdy jsou výrazně zamokřené nebo dokonce dočasně zaplavené. Obvykle jsou kyselé (pH 3 až pH 6), obsahují vysoký podíl pomalu se rozkládajících organických zbytků, mají velmi nízkou hladinu makroelementů (K, N, P, Ca aj.) a v důsledku zamokření bývají půdy částečně nebo celkově zbaveny kyslíku (hypoxie, anoxie) (Adamec 1997).

Má práce navazuje na výzkum Dr. L. Adamce, který se zabýval minerální výživou MR (Adamec 2002). K interpretaci výsledků své práce potřeboval znát anatomickou strukturu kořenů MR, ale v literatuře nenarazil na recentní anatomické studie kořenů MR a tato skutečnost ho vedla k zadání mé bakalářské práce.

Na MR bylo do této doby provedeno mnoho studií, které se zabývaly anatomii nadzemních částí či morfologií MR (např. Miranda a Sajo 2000). O anatomii kořenů MR se však v literatuře (Engler a Prantl 1891; Solereder 1899; Engler 1906; Solereder 1908; Němec 1930; Engler a Harms 1936; Metcalfe a Chalk 1950; Sculthorpe 1967; Studnička (a) 1984; Mauseth 1988; Lowrie 1989; Waisel et al. 1991; Kutschera, Sobotik (a) 1992; Kutschera, Sobotik (b) 1992; Studnička 1993; Studnička 1994) místy podařilo nalézt pouze nedostačující zmínky. V žádné z nich nebylo zmíněno, o jaký typ kořene se vlastně jedná (zda embryonální, adventivní či jiný) a chyběli mikrofotografie jejich anatomické stavby. K dispozici byly pouze náčrtky s malou vypovídací hodnotou.

Cílem práce je popis a anatomické zhodnocení stavby kořenů vybraných druhů MR se zaměřením na adaptace k anoxickému prostředí (přítomnost kořenového vlášení, impregnace kořene, velikost a zastoupení intercelulár popřípadě aerenchymu, rozsah zastoupení cévních svazků a přítomnost škrobových zrn). Dá se předpokládat,

¹ Dále jen MR

že tyto rostliny budou mít anatomické adaptace k anoxii, zamokření a minerální podvýživě stejně jako ostatní mokřadní rostliny.

Dalším cílem této práce je vytvoření kvalitního obrazového materiálu, který by dokumentoval studovanou anatomickou stavbu kořenů MR a porovnání využití klasické a digitální fotografie při dokumentaci anatomické stavby kořenů.

2. MATERIÁL A METODIKA

Objekty mé práce byly tyto druhy:

Rosnatka – *Drosera adelae* F.MUELL – vyskytuje se pouze na ostrově Hinchinbrook a na malém přilehlém území na severovýchodě australského kontinentu. Roste v tropickém deštném lese v nízkých nadmořských výškách. Vyhledává stinné a velmi vlhké biotopy v podrostu lesa (stinné vlhké břehy potoků a zátok, stinné skály porostlé mechem). Tvoří růžice s listy o délce 5 –20 cm. Rozmnožuje se převážně vegetativně [Obr. 1.].

Špirlice – *Sarracenia rubra* WALT. – velmi vlhkomilná, žije v močálech a slatiništích na JV Severní Ameriky (nesouvisle od Luisiany po Severní Karolínu). Jde o velmi proměnlivý druh (bylo popsáno pět poddruhů). Tvoří růžice listových láček, rostoucích kolmo až do výšky 60 cm [Obr. 3.].

Mucholapka – *Dionaea muscipula* ELL. – vyskytuje se v krátkostébelných ostřicových a travnatých společenstvech na slatiništích v Severní a Jižní Karolíně. Je to vytrvalá a dlouhověká rostlina. Velmi dobře snáší i úplné a dlouhodobé zaplavení. Potřebuje hodně světla. Tvoří růžice o průměru 7 – 14 cm [Obr. 5.].

Práce měla původně zahrnovat i druh *Drosera rotundifolia*, ale pro značné obtíže při zpracovávání parafinovou technikou byl po dohodě s vedoucím práce vyřazen.

2.1 ODBĚR MATERIÁLU

Všechny studované rostliny pocházely ze skleníkové sbírky masožravých rostlin Botanického ústavu AV ČR v Třeboni. Rostliny vznikly vegetativním množáním exemplářů ve sbírce a byly pěstovány v substrátu odpovídajícímu charakterem, zamokřením a kyselostí přírodním podmínkám. Rosnatka a špirlice byly pěstovány v lázeňské slatině s příměsí perlitu a písku, mucholapka v borové hrabance s příměsí vermikulitu. Květináčky s rostlinami byly umístěny v plastových vanách, částečně uzavřených igelitovou plachtou, do skelníku. Všechny rostliny byly zalévány dešťovou vodou a to tak, že květináčky byly trvale ponořeny 2-3 cm ve vodě.

Všechny studované rostliny byly dospělé, staré cca jeden rok, až na rostliny druhu *Sarracenia rubra*, které byly staré dva roky.

Od každého druhu byly vybrány 3 rostliny. Z každé byl odebrán jeden vybraný adventivní kořen [Obr. 2, 4, 6]. Odebrané kořeny byly různé délky (*Drosera adelae* 3,8, 4,0 a 6,5 cm, *Dionaea muscipula* 3,5, 3,7 a 4,0 cm a *Sarracenia rubra* 7,2, 8,0 a 11,0 cm).

2.2 ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU

Po odebrání z rostliny byl kořen několikrát krátce vytřepán ve vodě, aby se zbavil zbytků rašeliny. Následovalo fixování v FAA (směs 5 ml 40% vodného roztoku formaldehydu, 90 ml 70% čistého ethanolu² a 5 ml ledové kyseliny octové) za pokojové teploty, které trvalo minimálně do dalšího dne. V laboratoři byly z fixovaného kořene odděleny studované segmenty o délce 3 mm z oblasti špičky, středu a baze kořene. Ty byly vypírány ve vyměňovaném 70% ethanolu 3× po 1 hodině a poté odvodněny ethanol – butanolovou řadou a zality do parafínu, viz Němec (1962).

Pomocí sáňkového mikrotomu byly zhotoveny řezy o tloušťce 10 μm (špička) respektive 15 μm (střed a baze)³. Po natažení, přilepení glycerin-bílkem a přischnutí řezů k podložnímu sklu, byly preparáty barveny.

Za standardní postup bylo zvoleno barvení alcianovou modří a safraninem dle Šírové (1995, 1997) a Reňáka (2001). Preparáty odparafinujeme xylen-ethanolovou řadou až do H_2O ⁴, odtud je vložíme na 2 minuty do 3% kyseliny octové a pak je 2 hodiny barvíme v 0,1% roztoku alcianové modři (Alcianblau 8 GS, Fluka) v 3% kyselině octové. Po barvení preparáty vyjmeme a vypereme 2 minuty v 3% kyselině octové. Dále je ponoříme na 2 minuty do H_2O a potom na 2 minuty do citrát-fosfátového pufru dle Hanče (1951) o pH 4,0. Pak je vyjmeme a ponoříme přes noc do 0,1% roztoku safraninu (Safranin T, Fluka) ve stejném citrát-fosfátovém pufru. Po barvení safraninem preparáty opláchneme ponořením na 2 minuty opět

² Není-li řečeno jinak, jde o vždy o čistý 96% ethanol

³ Obecně se dospělé části kořene, tj. base, zpracovávají obtížněji, z čehož plyne horší kvalita řezů

⁴ V práci byla vždy používána demineralizovaná voda

do stejného citrát-fosfátovém pufru a odvodňujeme je 2× po 30 vteřinách v ethanolu. Nakonec je přes xylen 2× po 2 minutách montujeme do solakrylu (Solakryl, Synthesia Kolín).

Některé řezy se špatně barvily standardním barvením alcianovou modří a safraninem. Proto pro porovnání byly souběžně s řezy MR barveny i řezy klíčního kořene bobu (*Vicia faba*) a řezy stonkem pelargónií (*Pelargonium peltatum*), které se podle Reňáka (2001) barvily tímto postupem velmi dobře. Řezy stonkem pelargónie i kořenem bobu byly zpracovány stejným způsobem jako řezy MR (fixace v FAA a zalití do parafínu).

Dále bylo vyzkoušeno barvení safraninem a anilinovou modří dle Hrubého a Pazourkové (1952). Preparáty odparafinujeme xylen-ethanolovou řadou až do ethanolu a ponoříme je na 15 minut do 1% roztoku safraninu v ethanolu, který byl předem v lázni vytemperován na teplotu 46 °C. Po barvení je opláchneme ponořením do ethanolu 2× po 10 vteřinách. Poté je barvíme 1 minutu v 1% ethanolovém roztoku anilinové modří (Anilinblau Spiritloslich, Geigy) a opláchneme je ponořením na 10 vteřin do ethanolu, s přidavkem ledové kyseliny octové (0,5 ml kys. octové na 50 ml ethanolu). Nakonec je přes xylen 2× 20 vteřin montujeme do solakrylu.

Rovněž bylo provedeno barvení vesuvinem dle Hrubého a Pazourkové (1952). Preparáty odparafinujeme xylen-ethanolovou řadou až do ethanolu a potom je barvíme 7 minut v 1% roztoku vesuvinu (Vesuvine, G.T. Gurr) v 33% ethanolu. Po skončení barvení diferencujeme řezy 20 vteřin v 50% ethanolu, pak je opláchneme ponořením na 10 vteřin do ethanolu a nakonec přes xylen 2× 20 vteřin montujeme do solakrylu.

Využita byla rovněž reakce tanin – chlorid železitý dle Kaviny (1932). Preparáty odparafinujeme xylen-ethanolovou řadou až do H₂O a odtud ponoříme na 10 minut do 1% vodného roztoku taninu (Tanin DAB-6, Lachema). Poté je opláchneme ponořením do H₂O na 5 vteřin a přesuneme je na 5 minut do 3% roztoku chloridu železitého (Ferrum Sesquichloratum pro analysi, Česká lučební továrna). Nakonec je vložíme na 5 min do H₂O, pak na 2× 2 minuty do ethanolu a přes xylen 2× po 2 minutách je montujeme do solakrylu.

Protože se vyskytly potíže se standardním barvením alcianovou modří a safraninem, provedl jsem histochemický test na lignin pomocí fluoroglucinolu dle

Reňáka (2001). Preparáty odparafinujeme xylen-ethanolovou řadou až do ethanolu, odtud je vyjmeme a nakápneme 1% ethanolový roztok fluoroglucinolu (Phloroglucinol, Fluka), který necháme 3 minuty působit. Pak roztok fluoroglucinolu opatrně odsajeme buničinou, nakápneme 25% roztok HCl a necháme jej působit několik minut (do zbarvení). Po pozorování v čerstvém stavu byly preparáty ponechány zaschnout a poté montovány do solakrylu. Barevnost se i zde během několika dnů vytrácí.

Jelikož studované objekty jsou samy o sobě zbarvené, byly zhotoveny slepé kontroly (pouze odparafinované řezy zalité do solakrylu).

2.3 FOTOGRAFOVÁNÍ

K získání dokumentačních mikrofotografií byly použity dva různé způsoby. Prvním bylo získání snímků klasickou „mokrou“ cestou. Používal jsem mikroskop AMPLIVAL ZEISS JENA s pankratickým kondenzorem, objektivy 10×, 16×, 20× a s PK okuláry 10×. Fotografoval jsem pomocí BELICHTUNGSAUTOMATIK ZEISS JENA na inverzní film KODAK EKTACHROM 64 T a z něj jsem nechal komerčně zhotovit fotografie⁵.

Druhým způsobem pak bylo získání snímků pomocí digitální CCD kamery. Používal jsem mikroskop OLYMPUS CX-40 se CCD kamerou OLYMPUS DP 10 a objektivy 10× a 20×. Digitální fotografie získány programem OLYMPUS DP-SOFT a pak byly zpracovány pomocí programu ACD SEE VERZE 3.1 (ACD Systems), MICROSOFT PHOTO EDITOR 3.0 (Microsoft Corp.) a JASC® PAINT SHOP PRO (™) VERSION 7.04.

⁵ Fotografie a filmy byly zpracovány firmou Fotostar Südcolor.

3. VÝSLEDKY

3.1 BARVENÍ A FOTODOKUMENTACE

Ověřoval jsem standardní barvení dle Šírové (1995, 1997) a Reňáka (2001). Výsledkem bylo zjištění, že u všech studovaných druhů MR nebyla barvitelnost dřevních elementů safraninem uspokojivá (zvláště u druhů *Drosera adelae* a *Dionaea muscipula*). Barvení alcianovou modří poskytovalo standardní výsledek, tj. zbarvení nezdřevnatělých stěn.

Kvůli vyloučení metodické chyby bylo provedeno souběžné barvení řezů kořenů MR s řezy kořenem bobu a řezy stonkem pelargónie. Srovnáním výsledků bylo ověřeno, že stejným postupem se dřevní elementy na řezech stonkem pelargónie a kořenem bobu barví velmi dobře, zatímco na řezech kořeny MR jen slabě.

Barvitelnost sekundárních buněčných stěn xylému safraninem je silně ovlivněna jejich lignifikací. Z tohoto důvodu byl proveden test na lignin pomocí fluoroglucinolu. Ten u všech studovaných druhů vyšel negativně.

Vzhledem k ne zcela uspokojivým výsledkům při barvení safraninem a alcianovou modří byly vyzkoušeny i jiné postupy barvení (barvení horkým roztokem safraninu a alcianovou modří, barvení vesuvinem a reakce tanin - chlorid železitý). Jelikož všechny tyto metodiky neposkytovaly významně lepší výsledky, než barvení dle standardního postupu, byla většina preparátů barvena safraninem a alcianovou modří.

Jako další výstup mojí práce byly dokumentační mikrofotografie zhotovené jak klasickou, tak digitální technikou. Mojí snahou bylo pořízení kvalitních snímků, ale zároveň jsem posuzoval i výhody a nevýhody obou způsobů.

Zjistil jsem, že rozlišovací schopnost klasické fotografie je neporovnatelná oproti fotografií digitální. Protože rychlost a cena pořízení digitální fotografie (s dostatečnou kvalitou a barevností) je výhodnější než u klasické fotografie, zhotovil jsem většinu fotografií pomocí CCD kamery. Pro srovnání uvádím snímek stejného řezu pořízeného klasickou a digitální cestou [Obr. 7 a 8].

3.2 ANATOMICKÁ STAVBA PŘÍČNÝCH ŘEZŮ KOŘENŮ MR

3.2.1 Rosnatka *Drosera adelae*

Slepé kontroly: Na řezu špičkou kořene rosnatky je patrné přirozené rezavohnědé zbarvení stěn rhizodermis, kořenového vlášení a endodermis. V řezech středem a bazí kořene je navíc hnědě zbarven i parenchym středního válce a vnější partie pericyklu. V buňkách primární kůry a středního válce jsou patrná škrobová zrna.

Po barvení alcianovou modří a safraninem je na řezech u špičky kořene rosnatky [Obr. 9] patrná přirozeně zbarvená rhizodermis s kořenovým vlášením. V primární kůře se vyskytují četné interceluláry a to „malé“ a „velké“. „Velké“ svou velikostí přesahují rozměry okolních parenchymatických buněk. Problémem je ale jejich obtížná identifikace. V subepidermální vrstvě primární kůry dochází k proliferaci buněk. Dále je zřetelná endodermis a jednovrstevný pericykl tvořený poměrně velkými buňkami. Ve středním válci se vyskytují lýkové póly uspořádané do kruhu (10 pólů), další tři lýkové póly jsou v centru středního válce. Dřevní elementy nejsou dosud zřetelné.

Po barvení alcianovou modří a safraninem je na řezu střední částí kořene rosnatky [Obr. 10] patrná přirozeně zbarvená rhizodermis s kořenovým vlášením. Struktura primární kůry je obdobná jako u řezu špičkou. Je zde silnější hypodermální vrstva buněk. Jsou zde opět patrné „velké“ a „malé“ interceluláry. Endodermis je zřetelná, pericykl a buňky parenchymu středního válce jsou přirozeně zbarveny. Cévní svazek je polyarchní, je zde patrná pokročilá diferenciacce dřevních elementů. Lýkové póly jsou dobře identifikovatelné až při větších zvětšeních a jeví stejné uspořádání jako na řezu špičkou. V buňkách parenchymu primární kůry, ve středním válci a pericyklu se nachází mnoho škrobových zrn.

Na řezu bazální částí kořene rosnatky, obarveném alcianovou modří a safraninem, [Obr. 11] vidíme, že rhizodermis je hůře identifikovatelná než na předchozích řezech. Některé buňky parenchymu primární kůry jsou zbarvené safraninem. Interceluláry v primární kůře jsou špatně rozeznatelné. Dále vidíme safraninem zbarvenou endodermis s pericyklem. Ve středním válci jsou špatně zřetelné lýkové póly a dřevní elementy jsou slabě zbarvené. V buňkách parenchymu středního válce a v pericyklu se nachází mnoho škrobových zrn.

3.2.2 Mucholapka *Dionaea muscipula*

Na slepých kontrolách je na řezech špičkou kořene mucholapky vidět hnědočerně zbarvená rhizodermis. Nelze tu identifikovat kořenové vlášení. Dále můžeme pozorovat hnědočerně zbarvenou endodermis a vícevrstevný pericykl. Na řezech středem a bazí kořene je hůře zřetelná rhizodermis. Endodermis a vícevrstevný pericykl je výrazněji zbarven než na řezu špičkou.

Rhizodermis je na alcianovou modří obarveném řezu špičky kořene mucholapky [Obr. 12] obtížně identifikovatelná. Nelze tu identifikovat kořenové vlášení. Primární kůra je homogenní s výskytem intercelulár. Je patrná přirozeně zbarvená endodermis. Dále vidíme vícevrstevný pericykl. Ve středním válci jsou poměrně hluboko zanořené čtyři lýkové póly. Dřevní elementy ještě nejsou diferencované.

Na řezu střední části kořene mucholapky obarveném alcianovou modří [Obr. 13] je rhizodermis obtížně zjištělná. Kořenového vlášení je špatně identifikovatelné. Primární kůra je parenchymatická s intercelulárami. Jsou ale obtížně identifikovatelné. Endodermis je intenzivně přirozeně zbarvená. Dále je párný vícevrstevný pericykl. Lýkové póly jsou zřetelné, dřevní elementy se zde začínají diferencovat.

Na řezu bazální částí kořene mucholapky obarveném alcianovou modří a safraninem [Obr. 14] je rhizodermis opět špatně identifikovatelná. Je bez kořenového vlášení. Primární kůra se skládá ze dvou zón. Periferní, zahrnující 4 až 5 vrstev buněk a centrální, tvořená parenchymatickými buňkami. V centrální vrstvě je mnoho „malých“ intercelulár, na několika místech tu dochází k proliferaci buněk. Safraninem zbarvená endodermis je dobře zřetelná. Pod ní se nachází vícevrstevný pericykl, jehož vnější vrstva se rovněž barví safraninem. Cévní svazek je hexarchní. Lýkové póly jsou dobře rozlišitelné.

3.2.3 Špirlice *Sarracenia rubra*

Na slepých kontrolách je na řezech špičkou kořene špirlice vidět hnědavě zbarvená rhizodermis, na které není patrné kořenové vlášení. Buňky hypodermální vrstvy primární kůry mají také hnědavě zbarvené buněčné stěny, ale slaběji než v případě rhizodermis. Na řezu bazí kořene je navíc vidět kořenové vlášení. Je zde

silnější hypodermální vrstva primární kůry, opět hnědě zbarvená jako v případě špičky a středu.

Na řezu špičkou kořene špirlice po barvení alcianovou modří a safraninem [Obr. 15] vidíme safraninem zbarvenou rhizodermis bez patrného kořenové vlášení. Parenchym primární kůry je tvořen dvěma zónami buněk. Periferní (hypodermální) zóna zahrnující 2 až 3 vrstvy buněk pod rhizodermis, zbarvených alcianovou modří, a pod ní nezbarvená centrální (parenchymatická) zóna zahrnující 4-5 vrstev buněk. Některé buňky centrální zóny obsahují safraninem zbarvená jádra, zbylé buňky jsou bezbarvé. Interceluláry v primární kůře nejsou příliš zřetelné. Endodermis je tvořena buňkami, jejichž stěny jsou zbarvené safraninem. Některé z těchto buněk mají protoplast zbarvený alcianovou modří. Pericykl je zde tvořen 2-3 vrstvami buněk. Parenchym středního válce je zbarvený alcianovou modří obdobně jako na řezech střední části kořene rosnatky. Vodivá pletiva ve středním válci nejsou ještě diferencována.

Na řezu střední částí kořene špirlice, obarveném alcianovou modří a safraninem, [Obr. 16] pozorujeme safraninem zbarvenou rhizodermis, bez identifikovatelného kořenového vlášení. Parenchym primární kůry je opět tvořen dvěma zónami buněk. Hypodermální zóna primární kůry je tvořena buňkami se ztlustlými stěnami obsahujícími safraninem zbarvené inkluze. Parenchym v centrální vrstvě tvoří paprscitě uspořádané „sloupečky“ buněk, mezi kterými jsou „velké“ interceluláry. Je zde dobře patrná safraninem zbarvená endodermis. Cévní svazek je pentarchní. Lýkové póly jsou slabě zbarvené.

Na řezu bazální částí kořene špirlice, obarveném alcianovou modří a safraninem, [Obr. 17] vidíme safraninem zbarvenou rhizodermis. Nelze tu identifikovat kořenové vlášení. Primární kůra je opět dvouvrstevná. Buňky hypodermální vrstvy mají ztlustlé stěny a obsahují inkluze, obojí zbarvené safraninem. Opět se zde nalézají sloupkovitá uspořádání buněk a „velké“ interceluláry. Endodermis je zřetelná, se stěnami buněk zbarvenými safraninem. Cévní svazek je opět pentarchní. Lýkové póly jsou dobře zbarvené alcianovou modří. Na snímku je vidět, jak se z vodivých pletiv středního válce endogenně odděluje boční kořen.

3.3 SHRNU TÍ

Společné znaky studovaných MR jsou: přirozeně hnědavě zbarvená rhizodermis (vyjma druhu *Dionaea muscipula*, kde nejeví pravidelné uspořádání) s viditelným kořenovým vlášením. Primární kůra je většinou rozdělená do dvou zón. Obvykle obsahuje mnoho intercelulár, které se vyskytují ve dvou variantách. Jednak jako „malé“ a jednak jako „velké“, které velikostí mnohdy přesahují velikost okolních buněk. Často se v parenchymu primární kůry a středním válci vyskytují škrobová zrna. Endodermis je vždy dobře zřetelná, v přirozeném stavu rovněž zbarvená. Lýko ve středním válci se barví dobře na rozdíl od dřeva.

Mezi anatomickými znaky jednotlivých druhů se vyskytují i některé ojedinělé zvláštnosti. Patří mezi ně vysoké množství kořenových vlásků (u druhu *Drosera adelae*), výskyt lýkových pólů v centrální části středního válce (u druhu *Drosera adelae*) a vysoký počet intercelulár v primární kůře (u všech studovaných druhů). V tabulce 1 jsou shrnuty pozorované anatomické znaky ze všech studovaných řezů kořenů MR.

Pro srovnání anatomických rozdílů uvádíme fotografie řezů střední částí tří kořenů druhu *Sarracenia rubra* [obr. 16, 18, 19]. Je zde rovněž patrné barevné varírování různých kořenů.

Druh / Výskyt znaku		koř. vlášení	boční kořeny	přirozeně zbarvená rhizodermis	2 zóny prim. kůry	Zbarvené inkluze v buňkách	"malé" interceluláry	"velké" interceluláry	přirozeně zbarvená endodermis	lýkové póly	dřevní póly
<i>Drosera adelae</i>	špička	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
	střed	+	-	+	-	+	+	+	+	+	×
	baze	+	-	+	-	-	+	-	+	+	×
<i>Dionaea muscipula</i>	špička	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
	střed	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	baze	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sarracenia rubra</i>	špička	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
	střed	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	baze	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabulka 1. : Shrnutí výskytu jednotlivých anatomických znaků na všech řezech (+ znak se vyskytoval; - znak se nevyskytoval, × diferenciace dřevních elementů je natolik mohutná, že se nedá mluvit o jednotlivých pólech)

4. DISKUSE

4.1 IDENTIFIKACE KOŘENE

Dle Studničky ((a) 1984, (b) 1984, 1993, 1994) vytvářejí druhy *Dionaea muscipula* a *Sarracenia rubra* z bazí listů cibulovité podzemní útvary (oddenky), ze kterých poté vyrůstají kořeny. Tyto útvary slouží hlavně k přečkávání nepříznivých podmínek. Někteří příslušníci rodu *Drosera* tvoří tzv. hibernakula, což jsou „zimní pupeny“ pro přečkání nepříznivých podmínek (zima, sucho). Mnou studované „kořeny“ mohly být (alespoň z části) pokračováním výše zmíněných útvarů. Podle výskytu kořenového vlášení a radiálního uspořádání cévního svazku jsem se ujistil, že jde opravdu o kořeny a protože všechny rostliny pocházely z vegetativního množení, muselo se jednat o adventivní kořeny.

4.2 PROBLEMATIKA BARVENÍ SEKUNDÁRNÍCH STĚN

V první etapě mé práce jsem zpracoval a obarvil kořeny MR dle postupu Šírové (1995, 1997) a Reňáka (2001), který vedl k vcelku uspokojivým výsledkům. Jediným problémem bylo špatné barvení sekundárních buněčných stěn (dřevní elementy) safraninem. Ze souběžného barvení řezů kořenů MR s řezy stonkem pelargónie a řezy kořene bobu vyplynulo, že barvitelnost sekundárních buněčných stěn na řezech pelargónií a bobem je výrazně lepší než u řezů MR.

K rozřešení problému kvality obarvení sekundárních buněčných stěn přispěla práce Reňáka (2001), který se domnívá, že barvitelnost sekundárních buněčných stěn safraninem je silně ovlivněna přítomností ligninu. Proto jsem se rozhodl otestovat řezy na přítomnost ligninu dle Reňákovy metodiky. U všech studovaných druhů vyšel negativně, což souhlasí s Reňákovou teorií.

Z těchto důvodů jsem se po studiu literatury (Kavina 1932; Johansen 1940; Hanč 1951; Hrubý a Pazourková 1952; Baker 1958; Sass 1958; Jensen 1962; Němec 1962; Gurr 1965; Beneš 1968; Gerlach 1977; O'Brien a McCully 1981; Ruzin 1999) rozhodl vyzkoušet další barvení, a to horkým ethanolovým roztokem safraninu a anilinovou modří (Hrubý a Pazourková 1952), vesuvinem (Hrubý a Pazourková 1952) a pomocí reakce tanin - chlorid železitý (Kavina 1932). Výsledky

těchto barvení byly srovnatelné se standardním barvením alcianovou modří a safraninem. Z tohoto důvodu byly další řezy barveny pouze tímto postupem.

4.3 SROVNÁNÍ FOTOGRAFICKÝCH TECHNIK

Při použití digitálního snímání jsem shledal velkou výhodou v takřka okamžitě viditelném snímku (nejzdlouhavějším procesem byl přesun snímku do počítače přes nízkorychlostní sériové rozhraní) a nízkých finančních nákladech na jeho zhotovení (když nepočítám pořizovací cenu CCD kamery). Bohužel na použité kameře OLYMPUS DP 10 se zaostřovalo na malém LCD displeji o velikosti cca 5×6 cm, tudíž bylo poněkud náročnější dosáhnout ostrých snímků, obzvláště při nižších zvětšeních. Ale výhodou bylo, že jsem si mohl vybrat nejlepší z několika snímků a odpadly tedy náklady na zhotovení nepovedených snímků jako v případě klasické fotografie.

Shledal jsem i několik nevýhod. První z nich je nižší rozlišení snímku oproti klasické fotografii, což je dáno typem čipu CCD kamery. Další je nižší dokumentační hodnota pořízených fotografií. To je dáno tím, že je lze vcelku snadno retušovat či pozměňovat.

Od klasické fotografie jsem si sliboval větší ostrost snímků a zároveň vyšší dokumentační hodnotu. Vlastní fotografování nebylo oproti digitálnímu snímání tak dlouhou záležitostí, ale bylo to vykoupeno vyšším počtem špatných snímků. Vyvolávání inverzních filmů a zhotovování fotografií z diapozitivů byla zdlouhavá a drahá záležitost. Navíc firma, která zpracovávala filmy a fotografie, měla pokaždé jinou výstupní kvalitu zakázek. Proto jsem od klasické fotografie ustoupil.

4.4 MASOŽRAVÉ VERSUS MOKŘADNÍ ROSTLINY

Všechny studované řezy jevily uspořádání typické pro kořen. Měly přirozeně zbarvenou rhizodermis (u druhu *Dionaea muscipula* nejevila pravidelné uspořádání) s kořenovým vlášením, primární kůru rozdělenou zpravidla do dvou zón, obsahující mnoho intercelulár; přirozeně zbarvenou endodermis a polyarchně uspořádaný cévní svazek.

Dále na nich byly pozorovány i některé zvláštnosti. Například na řezech u špičky druhu *Drosera adelae* se vyskytovalo centrálně umístěné lýko. Ve starších částech kořene byla většina dřevních elementů nelignifikovaných. To je pravděpodobně způsobeno tím, že jejich funkce (tak jako u mokřadních rostlin) je primárně transpirační a nikoliv mechanická.

Jiným zajímavým znakem byl výskyt „velkých“ intercelulár v primární kůře. Může se však jednat jen o řez v nejširší části interceluláry.

Porovnával jsem i poměry velikosti plochy středního válce k velikosti plochy celého řezu jakožto jednu z uvažovaných adaptací kořenů na zamokření. Výsledky jsou uvedeny pro MR (Tabulka 2.) a pro mokřadní rostliny (Tabulka 3.). Zbytek do sta procent tvoří podíl plochy primární kůry na řezu. Hodnoty jsou průměry několika měření.

Druhy MR		<i>Drosera adelae</i>	<i>Dionaea muscipula</i>	<i>Sarracenia rubra</i>
Poměr plochy středního válce k ploše celého řezu kořene [%]	Špička	59,39	32,92	21,66
	Střed	46,29	38,09	25,00
	Baze	48,42	34,08	20,24
	Průměr	51,37	35,03	22,30

Tabulka 2.: Srovnání poměru velikosti středního válce k velikosti celého řezu u MR.

Druhy mokřadních rostlin	<i>Apium nodiflorum</i>	<i>Carex nigra</i>	<i>Cladium jamaicense</i>	<i>Juncus inflexus</i>	<i>Oryza sativa</i>
Poměr plochy středního válce ku ploše celého řezu kořene [%]	3,17	4,86	5,44	6,00	4,07
Druhy mokřadních rostlin	<i>Phragmites australis</i>	<i>Ranunculus ficaria bulbifer</i>	<i>Rumex crispus</i>	<i>Scrophularia vernalis</i>	<i>Typha domingensis</i>
Poměr plochy středního válce ku ploše celého řezu kořene [%]	6,61	2,74	4,50	23,23	3,76

Tabulka 3.: Srovnání poměru velikosti středního válce k velikosti celého řezu u mokřadních rostlin.

V pracích (Justin a Armstrong 1987, Laan et al. (a) 1989, Laan et al. (b) 1989, Armstrong et al. 1991, Chabbi et al. 2000), na kterých jsem prováděl měření ploch u mokřadních rostlin, nebylo uvedeno, ze kterých segmentů kořene řezu pochází. Budeme-li však porovnávat zprůměrované poměry u MR a poměry u mokřadních rostlin, uvidíme, že u mokřadních rostlin je mnohem větší prostor v kořeni věnován primární kůře s intercelulárami (popřípadě aerenchymem) než v kořenech MR. Navíc je v primární kůře u mokřadních rostlin mnohem větší podíl intercelulár a aerenchymu (cca 30 až 70% plochy řezu) než u MR (cca 20 až 50% plochy řezu).

Nižší výskyt intercelulár a absenci aerenchymu v primární kůře MR si vykládám jako odlišnou adaptaci MR na anaerobní přírodní podmínky. Jelikož jsou kořeny MR silně impregnované, mohla by tato impregnace působit proti ztrátě kyslíku difusí z kořene. a by pak mohla být jedním z dalších faktorů, které ovlivňují barvení řezů kořenů MR.

Srovnáním dalších znaků (délka kořene, přítomnost vlášení, uspořádání cévních svazků) a jejich konfrontací s anatomickou literaturou (Solereeder 1899; Solereeder 1908; Němec 1930; Prát 1944; Metcalfe a Chalk et al 1950; Razdorskij 1954; Mauseth 1988; Waisel et al. 1991; Kutschera a Sobotik (a) 1992; Kutschera a Sobotik (b) 1992) a literaturou o anatomii a fyziologii mokřadních rostlin (Webb a Armstrong 1983; Justin a Armstrong 1987; Laan et al. (a) 1989; Laan et al. (b) 1989; Armstrong et al. 1991; Laan et al. 1991; Crawford 1993; Crawford a Braendle 1996; Chabbi et al 2000; Soukup et al. 2002) jsem dospěl k závěru, že mnou popsány znaky se velmi podobají znakům mokřadních rostlin. Nemohu však s jistotou říci, zda nejsou nějak ovlivněny i masožravostí těchto rostlin.

5. ZÁVĚR

Zabýval jsem se srovnávací anatomíí kořenů tří vybraných druhů masožravých rostlin.

- I. Standardní postup barvení alcianovou modří a safraninem dle Šírové (1995, 1997) a Reňáka (2001) se osvědčil jen částečně, neboť barvitelnost řezů safraninem nebyla dostatečná. Barvení jinými barvivy (anilínová modř a safranin, vesuvin, reakce tanin –chlorid železitý) dávalo obdobné výsledky.
- II. Barvení sekundárních buněčných stěn safraninem je velmi pravděpodobně ovlivněno přítomností ligninu, což je v souladu s Reňákovým tvrzením.
- III. Jako nejvhodnější postup k pořízení mikrofotografií se ukázalo digitální fotografování pomocí CCD kamery. Dokumentační hodnota digitálních fotografií je oproti klasickým menší. Klasická fotografie „mokrou“ cestou se hlavně z časových a finančních důvodů neosvědčila.
- IV. Kořeny MR mají zpravidla impregnovanou rhizodermis s kořenovým vlášením (druh *Dionaea muscipula* ho má velmi nízký počet). Primární kůra je obvykle dělena do dvou zón a obsahuje velké množství intercelulár (parenchym primární kůry u druhu *Sarracenia rubra* tvoří sloupečkovitá uspořádání okolo obřích intercelulár). Endodermis je rovněž impregnovaná. U druhu *Drosera adelae* se na řezech v blízkosti špičky tvoří 2 skupiny lýkových pólů, kde kromě typického uspořádání v periferních částech středního válce se vyskytuje skupina lýkových pólů i v centru středního válce. Dřevní elementy v kořenech nejsou lignifikované. Cévní svazek je polyarchní.
- V. Na základě studií vlastních preparátů a literatury, vztahující se k mokřadním rostlinám, se domnívám, že anatomická stavba kořenů je nejsilněji ovlivněna biotopem, ve kterém dané rostliny žijí. Ukazují na to podobné adaptace mokřadních a masožravých rostlin, obývajících nepříliš odlišné či úplně stejné biotopy.

6. LITERATURA

Adamec L.: Mineral nutrition of carnivorous plants: A review. *Botanical Revue* **63:** 273-299, 1997.

Adamec L.: Leaf absorption of mineral nutrients in carnivorous plants stimulates root nutrient uptake. *New Phytologist* **155:** (in press) , 2002.

Armstrong W., Justin S. H. F. W., Beckett P. M., Lythe S.: Root adaptation to soil waterlogging. *Aquatic Botany* **39:** 57-73, 1991.

Baker J. R.: Principles of biological microtechnique. Methuen, London, 1958.

Beneš K.: On the stainability of plant cell walls with alcian blue. *Biologia Plantarum* **10:** 334-346, 1968.

Chabbi A., McKee K. L., Mendelssohn I. A.: Fate of oxygen losses from *Typha domingensis* (Typhaceae) and *Cladium jamaicense* (Cyperaceae) and consequences for root metabolism. *American Journal of Botany* **87:** 1081-1090, 2000.

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

Crawford R. M. M., Braendle R.: Oxygen deprivation stress in changing environment. *Journal of Experimental Botany* Vol. **47:** 145-159, 1996.

Engler A., Prantl K.: Die natürlichen Pflanzenfamilien, Teil III., 2. Abteilung. Engleman, Leipzig, 1891.

Engler A.: Das Pflanzenreich – IV. Droseraceae . Engleman, Leipzig, 1906.

Engler A., Harms H.: Die natürlichen Pflanzenfamilien, Band 17b. Engleman, Leipzig, 1936.

- Gerlach D.:** Botanische Mikrotechnik. Thieme, Stuttgart, 1977.
- Gurr E.:** The rational use of dyes in biology. Hill, London, 1965.
- Hanč O.:** Chemická laboratorní příručka. Průmyslové vydavatelství, Praha, 1951.
- Hrubý K., Pazourková Z.:** Základy mikroskopické techniky. SPN, Praha, 1952.
- Jensen W. A.:** Botanical histochemistry. Freeman, San Francisco, 1962.
- Johansen D. A.:** Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York, 1940.
- Justin S. H. F. W., Armstrong W.:** The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist* **106**: 465-495, 1987.
- Kavina K.:** Botanická mikrotechnika. Ministerstvo zemědělství ČSR, Praha, 1932.
- Kutschera L., Sobotik M. (a):** Wurtzelatlas mitteleuropäischer Grünlandpflanzen - Band 2. Pteridophyta und Dicotyledonae, Teil 1. Morphologie, Anatomie, Ökologie, Verbreitung, Soziologie, Wirtschaft. Fischer, Stuttgart, 1992.
- Kutschera L., Sobotik M. (b):** Wurtzelatlas mitteleuropäischer Grünlandpflanzen - Band 2. Pteridophyta und Dicotyledonae, Teil 2. Anatomie. Fischer, Stuttgart, 1992.
- Laan P., Berrevoets M. J., Lythe S., Armstrong W., Blom C. W. P. M. (a) :** Root morphology and aerenchyma formation as indicators for flood tolerance of *Rumex* species. *Journal of Ecology* **77**: 693-703, 1989.
- Laan P., Smolders A., Blom C. W. P. M., Armstrong W. (b):** The relative roles of internal aeration, radial oxygen losses, iron exclusion and nutrient balances in flood-tolerance of *Rumex* species. *Acta Botanica Neerl.* **38**: 131-145, 1989.

Laan P., Tosserams M., Huys P., Bienfait H. F.: Oxygen uptake by roots of *Rumex* species at different temperatures: The relative importance of diffusive resistance and enzyme kinetics. *Plant, Cell and Environment* **14**: 235-240, 1991.

Lloyd F. E.: The Carnivorous Plants. Chronica Botanica Company, **Vol. 9**, Waltham, Massachusetts, 1942.

Lowrie A.: Carnivorous Plants of Australia Vol. 2. University of Western Australia Press, Nedlands, West Australia, 1989.

Mauseth J. D.: Plant anatomy. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Menlo Park, California, 1988.

Metcalf C. R., Chalk L. et al.: Anatomy of Dicotyledons - Vol. 1. The Clarendon Press, Oxford, 1950.

Miranda V. F.O., Sajo M. d G.: Morphoanatomy of the post-seminal development of seed of three species of *Drosera*. Bolsista Iniciação Científica – FAPESP, Rio Claro, 2000.

Němec B.: Nauka o buňce. Anatomie rostlin. Aventinum, Praha, 1930.

Němec B.: Botanická mikrotechnika. ČSAV, Praha, 1962

O'Brien T. P., McCully M. E.: The study of plant structure. Principles and selected methods. Termacarphi, Melbourne, 1981.

Prát S.: Rostlina pod drobnohledem. Česká grafická unie, Praha, 1944.

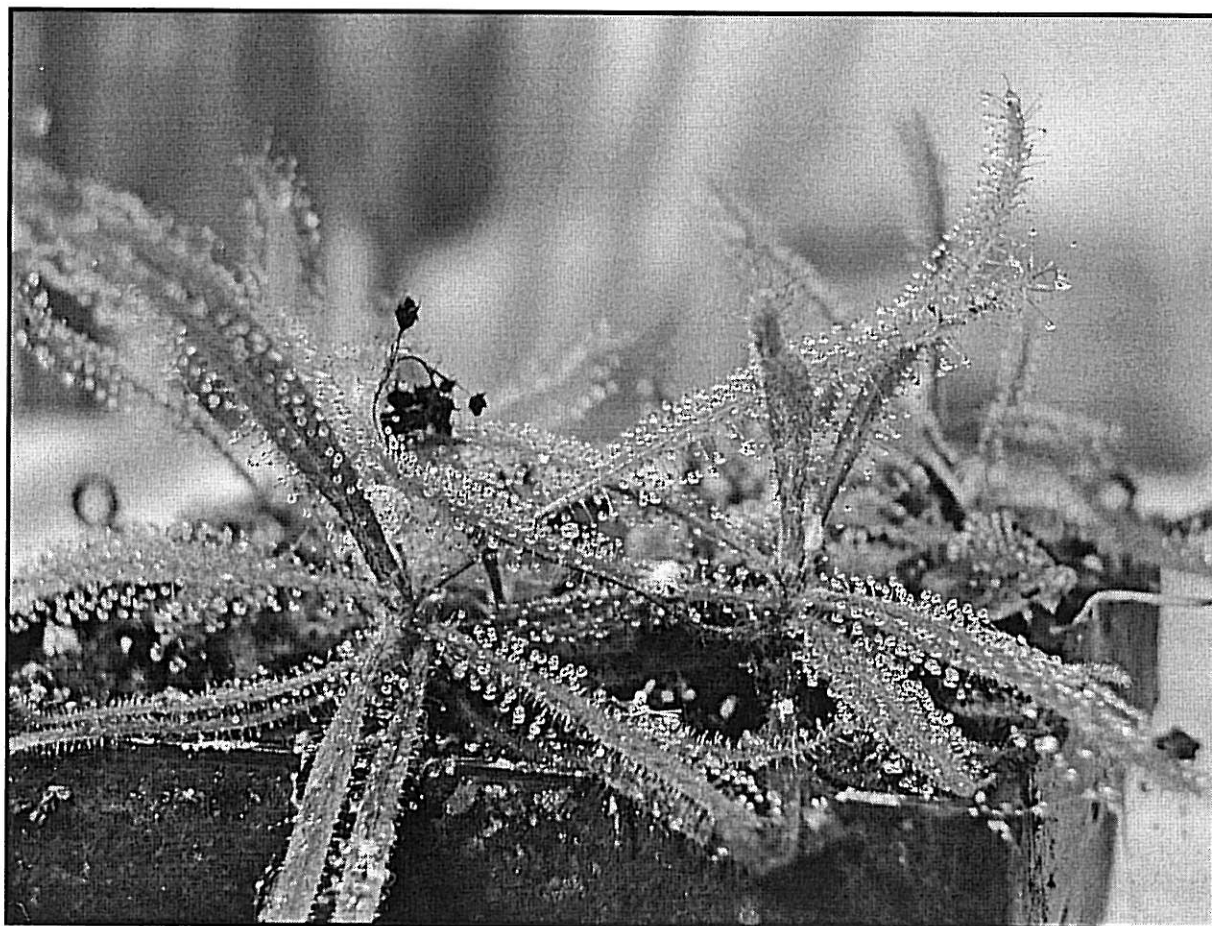
Razdorskij V.F.: Anatomie rostlin. ČSAV, Praha, 1954.

- Reňák D.:** Sklerenchymatický prstenec ve stonku *Pelargonium peltatum Ait* – metody znázornění a histogeneze. BF JU, České Budějovice, 2001. (Bakalářská práce).
- Ruzin S. E.:** Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, New York, 1999.
- Sass J. E.:** Botanical microtechnique. College press, Ames, 1958.
- Sculthorpe C. D.:** The biology of aquatic vascular plants. Edward Arnold Ltd., London, 1967.
- Solereeder H.:** Systematische anatomie der Dicotyledonen. Enke, Stuttgart, 1899.
- Solereeder H.:** Systematische anatomie der Dicotyledonen. Engleman, Stuttgart, 1908.
- Soukup A., Votrubová O., Čížková H.:** Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. New Phytologist **153**: 277-287, 2002.
- Studnička M. (a):** Masožravé rostliny. Academia, Praha, 1984.
- Studnička M. (b):** Mucholapka podivná. Živa **4**: 133-135, 1984.
- Studnička M.:** Rosnatky – Rod plný zvláštností. Živa **3**: 103-105, 1993.
- Studnička M.:** Rosnatky australského severu. Živa **1**: 7-9, 1994.
- Šírová V.:** Diferenciální barvení zdřevnatělých buněčných stěn. BF JU, České Budějovice, 1995. (Bakalářská práce).
- Šírová V.:** Příspěvek ke standardizaci diferenciálního barvení alcianovou modří a safraninem. BF JU, České Budějovice, 1997. (Magisterská práce).

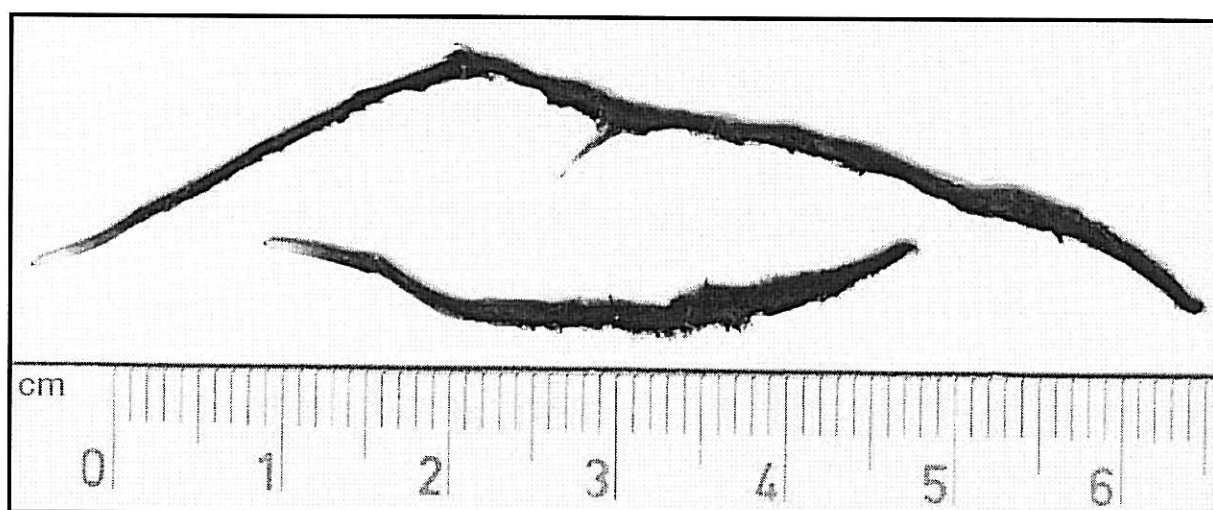
Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U.: Plant roots: The hidden half. Marcel Dekker, Inc., New York, 1991.

Webb T., Armstrong W.: The effects of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. *Journal of Experimental Botany* **34**: 579-603, 1983.

7. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA



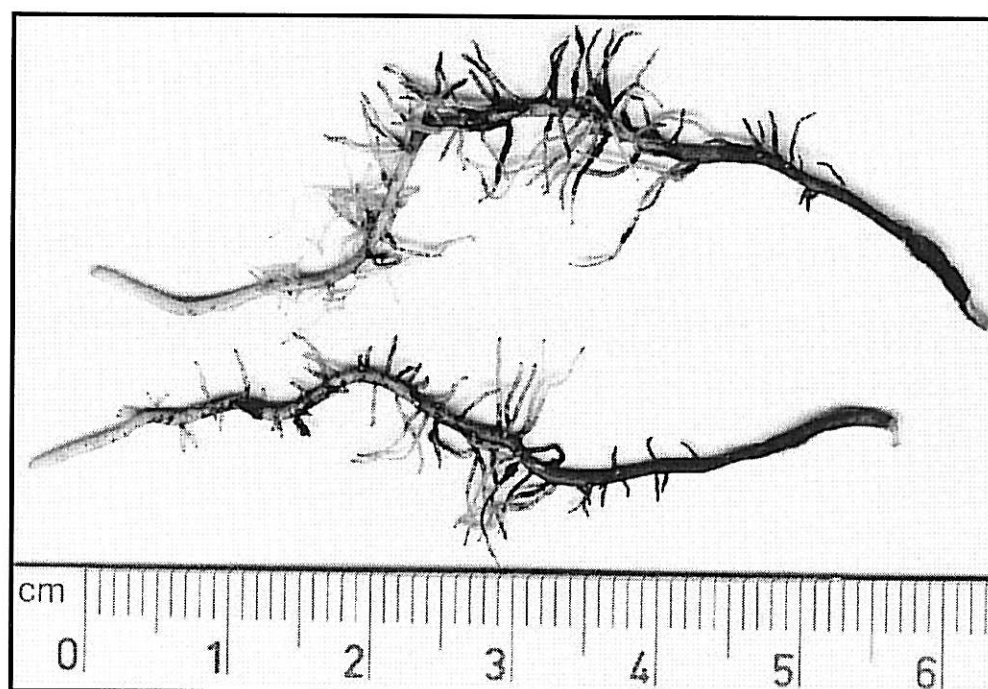
Obr. 1.- Drosera adelae



Obr. 2.- Odebrané kořeny D. adelae



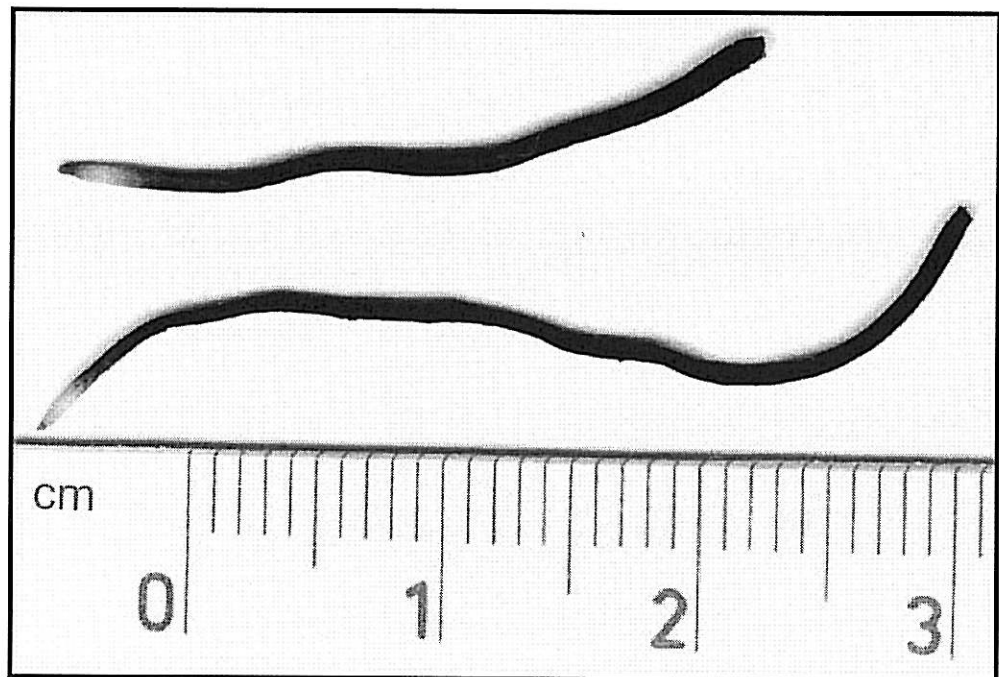
Obr. 3.-Sarracenia rubra



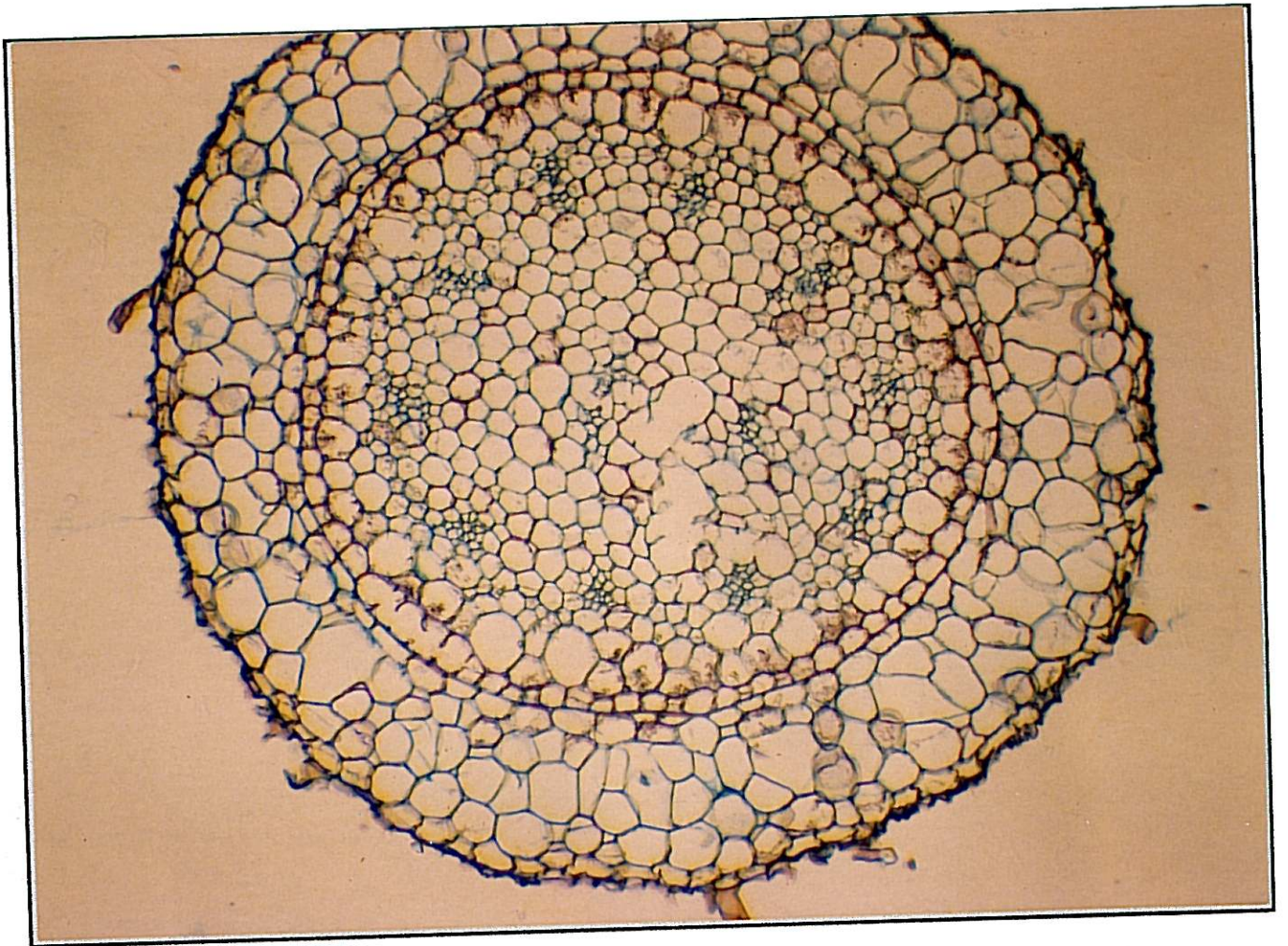
Obr. 4.- Odebírané kořeny S. rubra



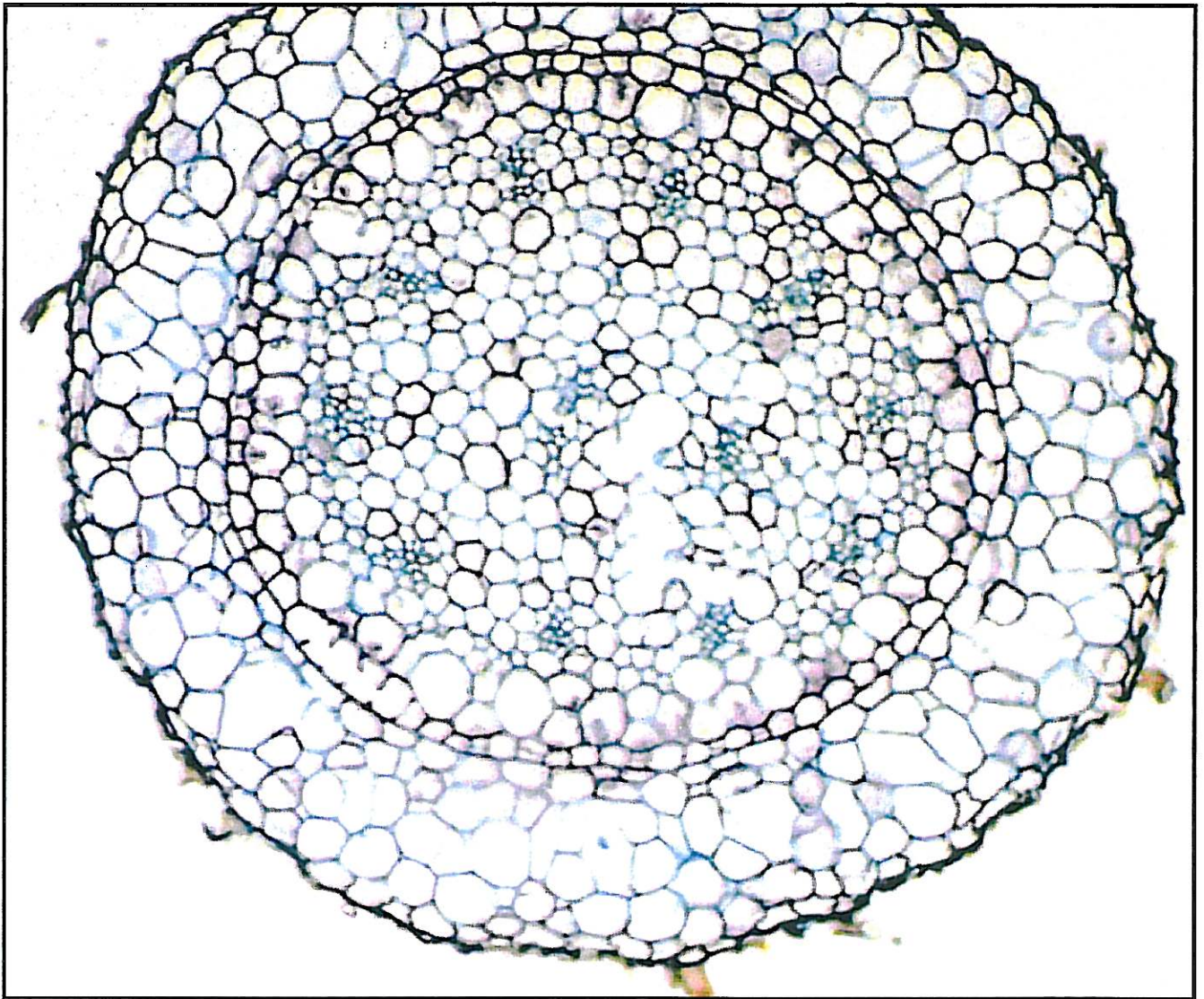
Obr. 5.- *Dionaea muscipula*



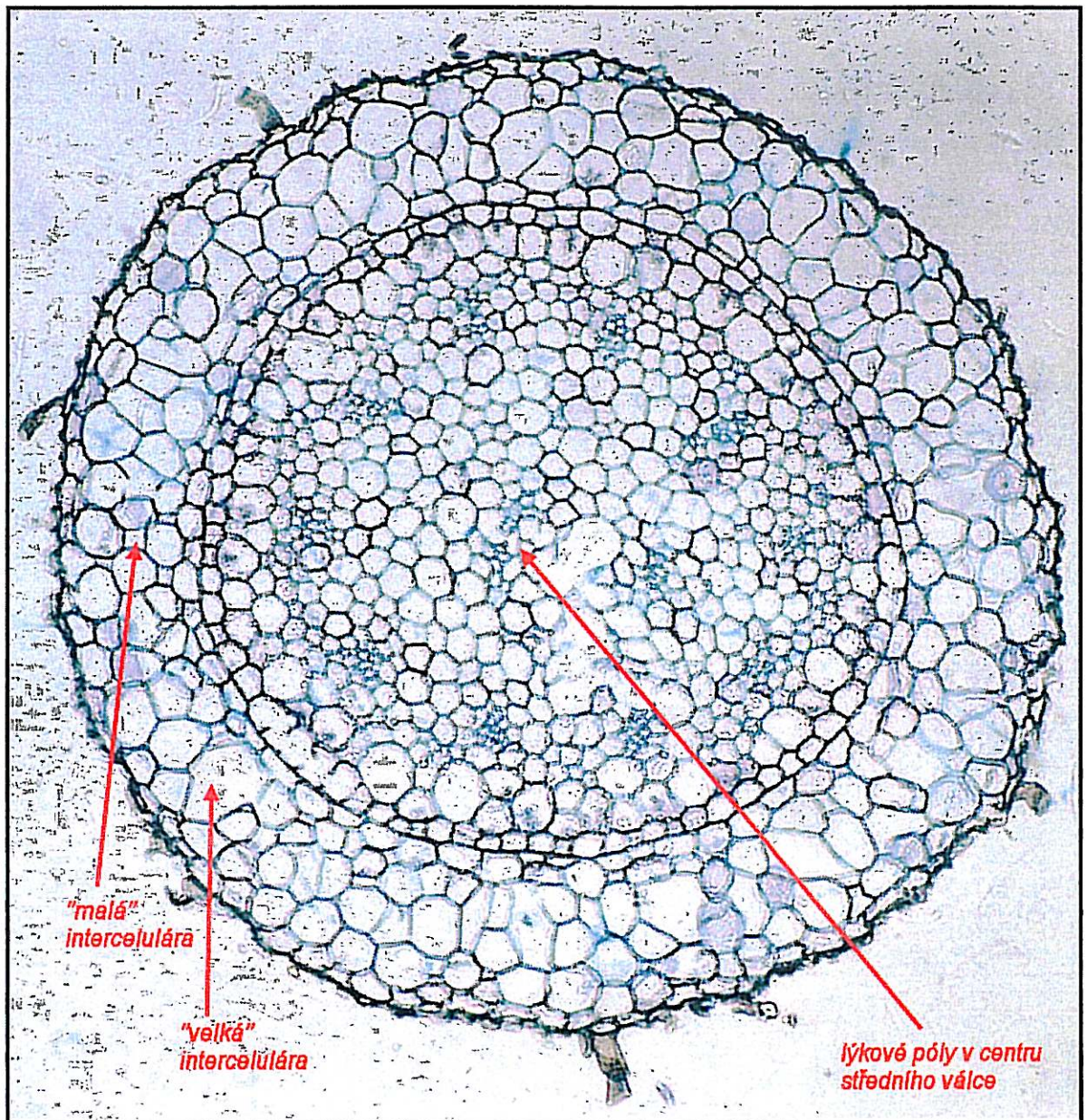
Obr. 6.- Odebírané kořeny *D. muscipula*



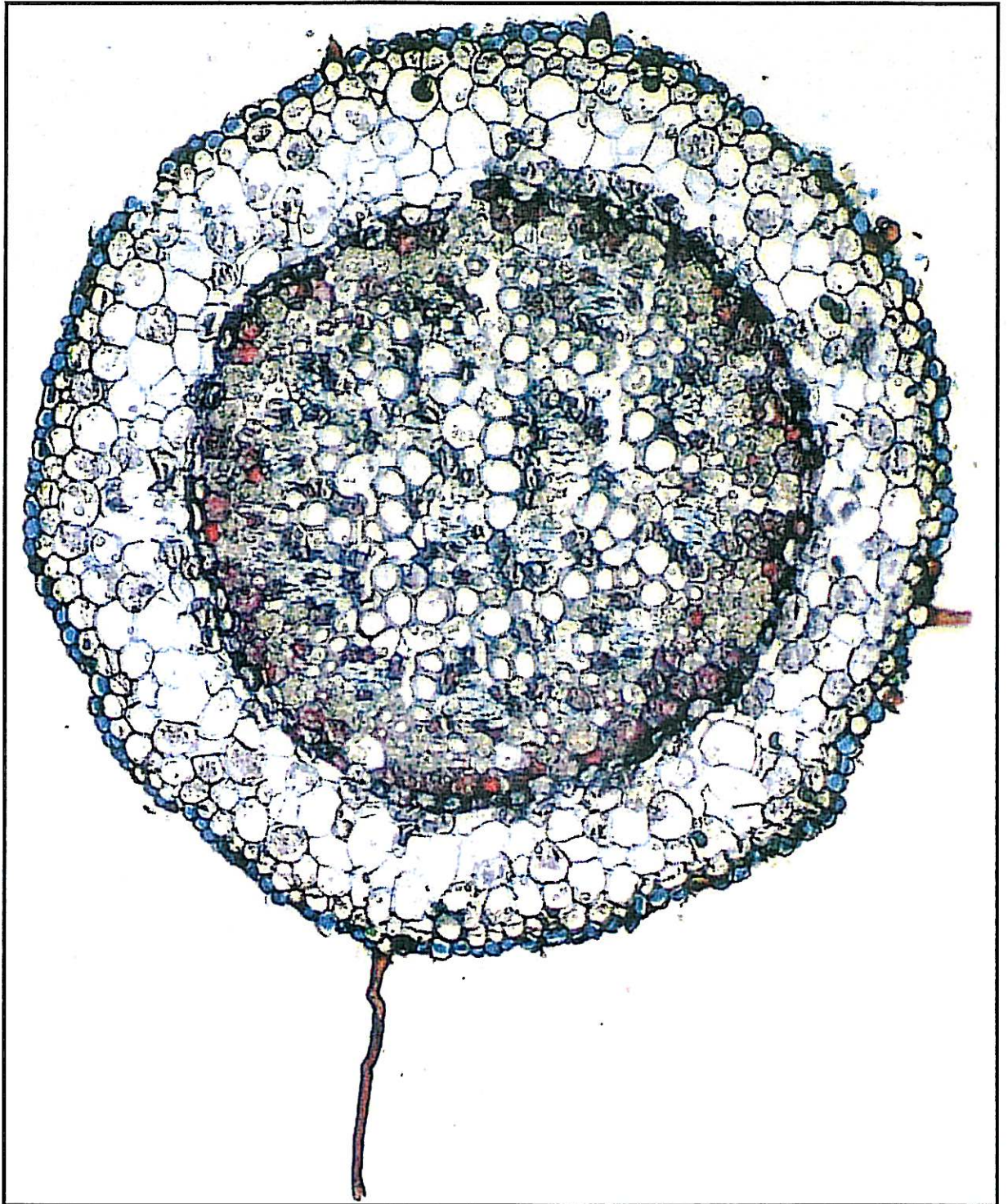
Obr. 7.- Mikrofotografie příčného řezu špičkou kořene Drosery adelae získaná klasickou technikou (Belichtungsautomatik Zeiss Jena, obj. planchrom. 10x, ok. PK 4x, Kodak Ektachrom 64T)



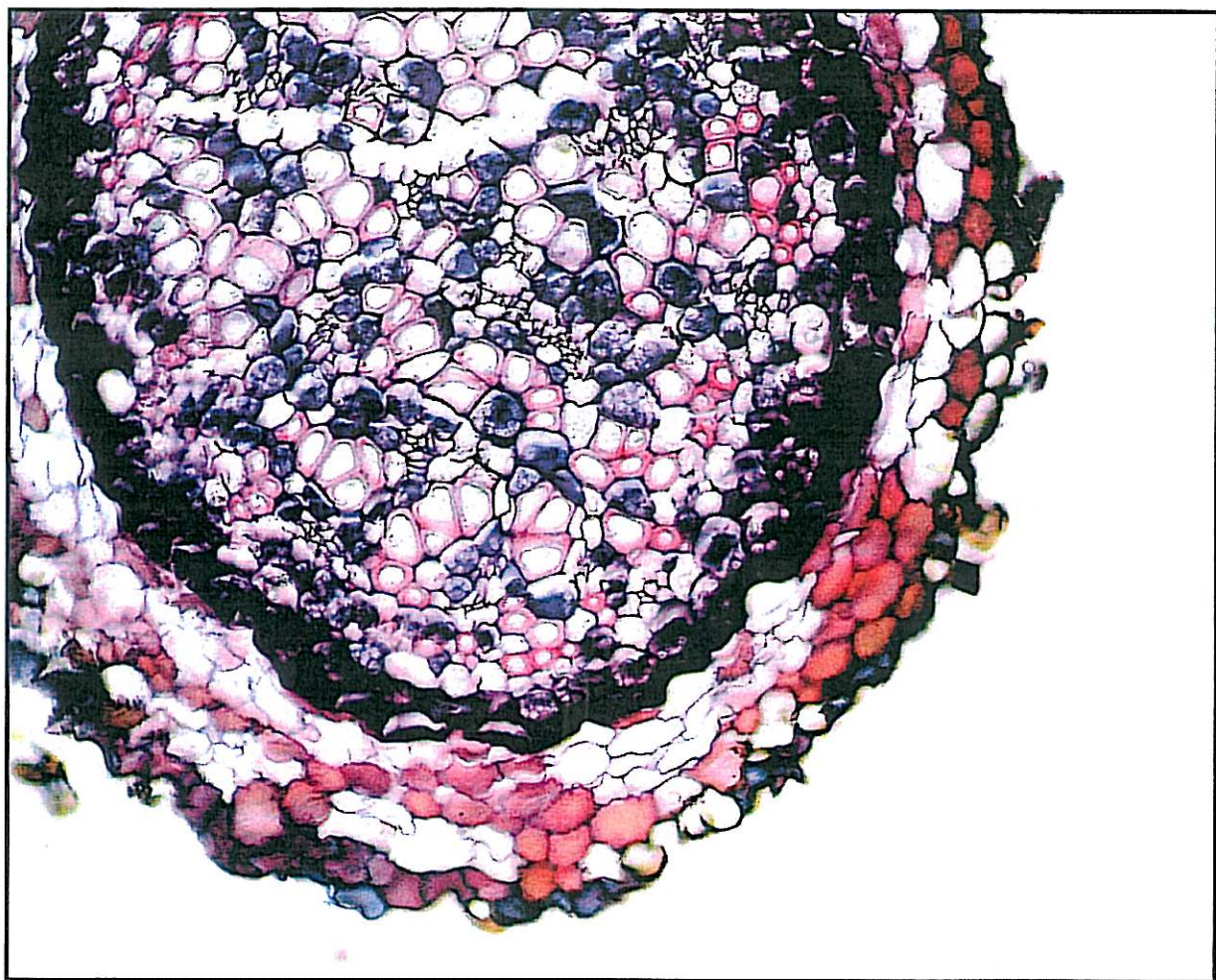
Obrázek 8.- Mikrofotografie příčného řezu špičkou kořene Drosery adelae získaná digitální technikou (velikostně upraveno dle Obr 7.)



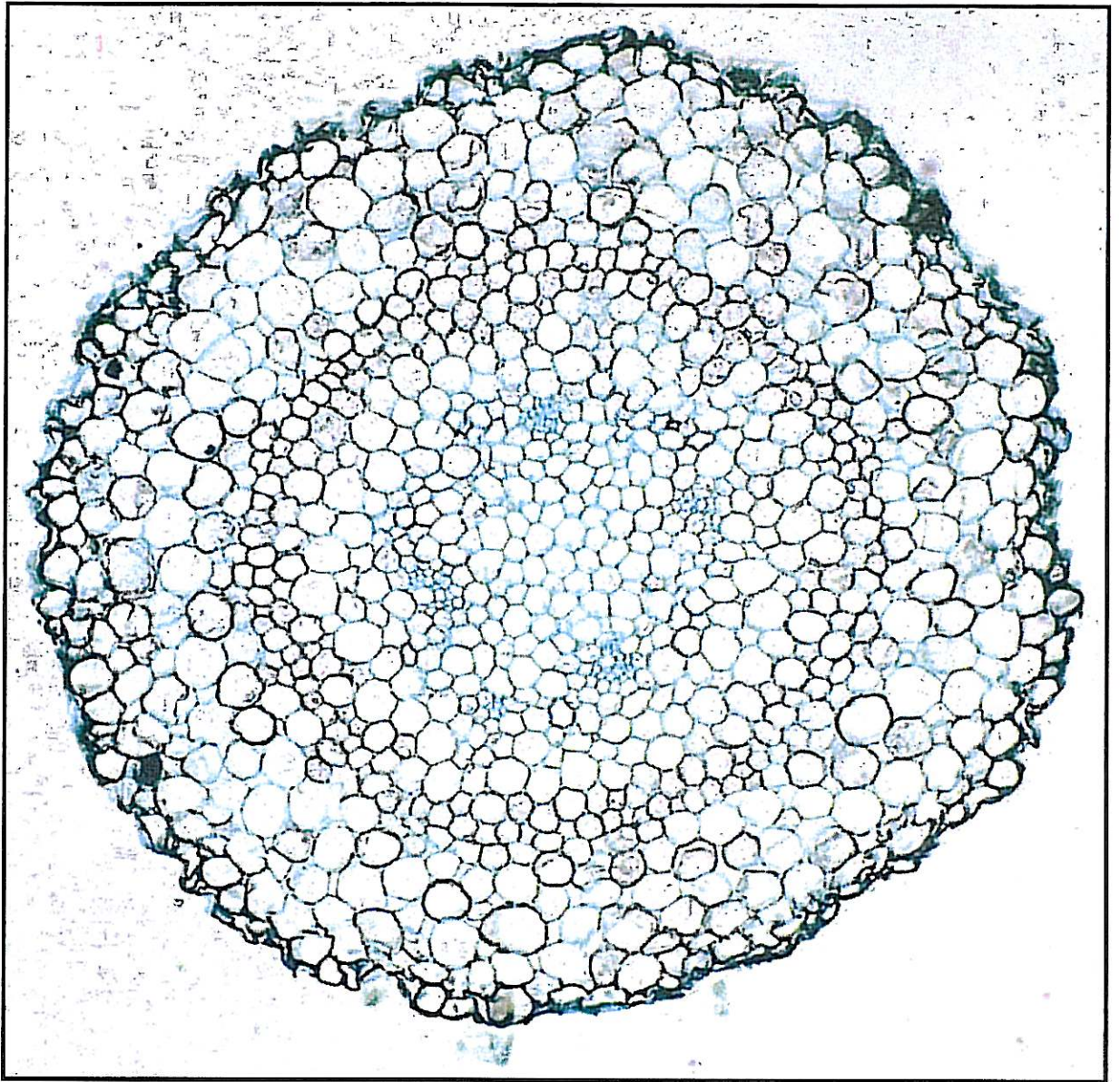
Obr. 9.- Příčný řez špičkou druhu *Drosera adelae* (objektiv 10x, velikostně upraveno)



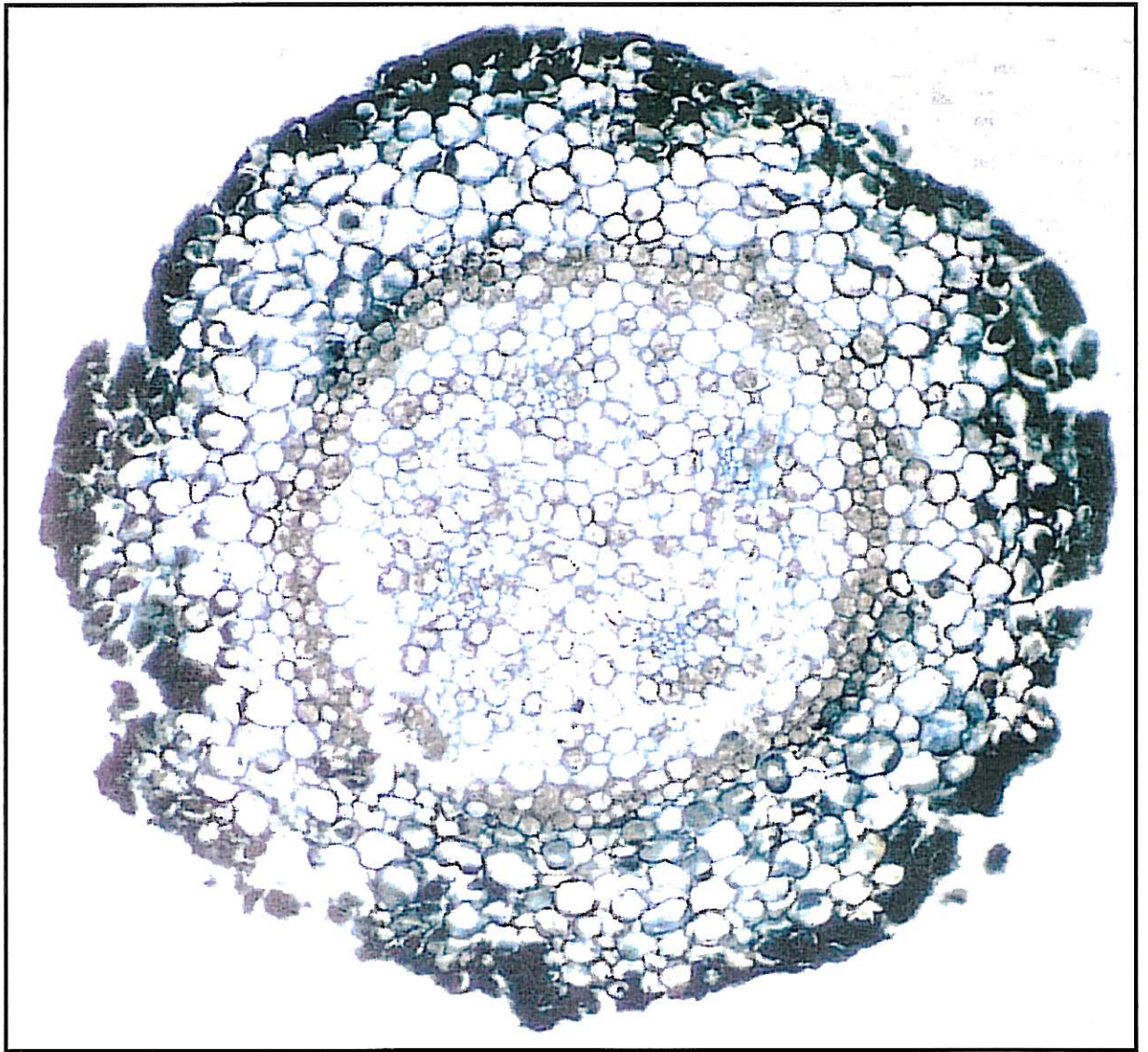
Obr. 10.- Příčný řez středem kořene druhu *Drosera adelae* (objektiv 10x, velikostně upraveno)



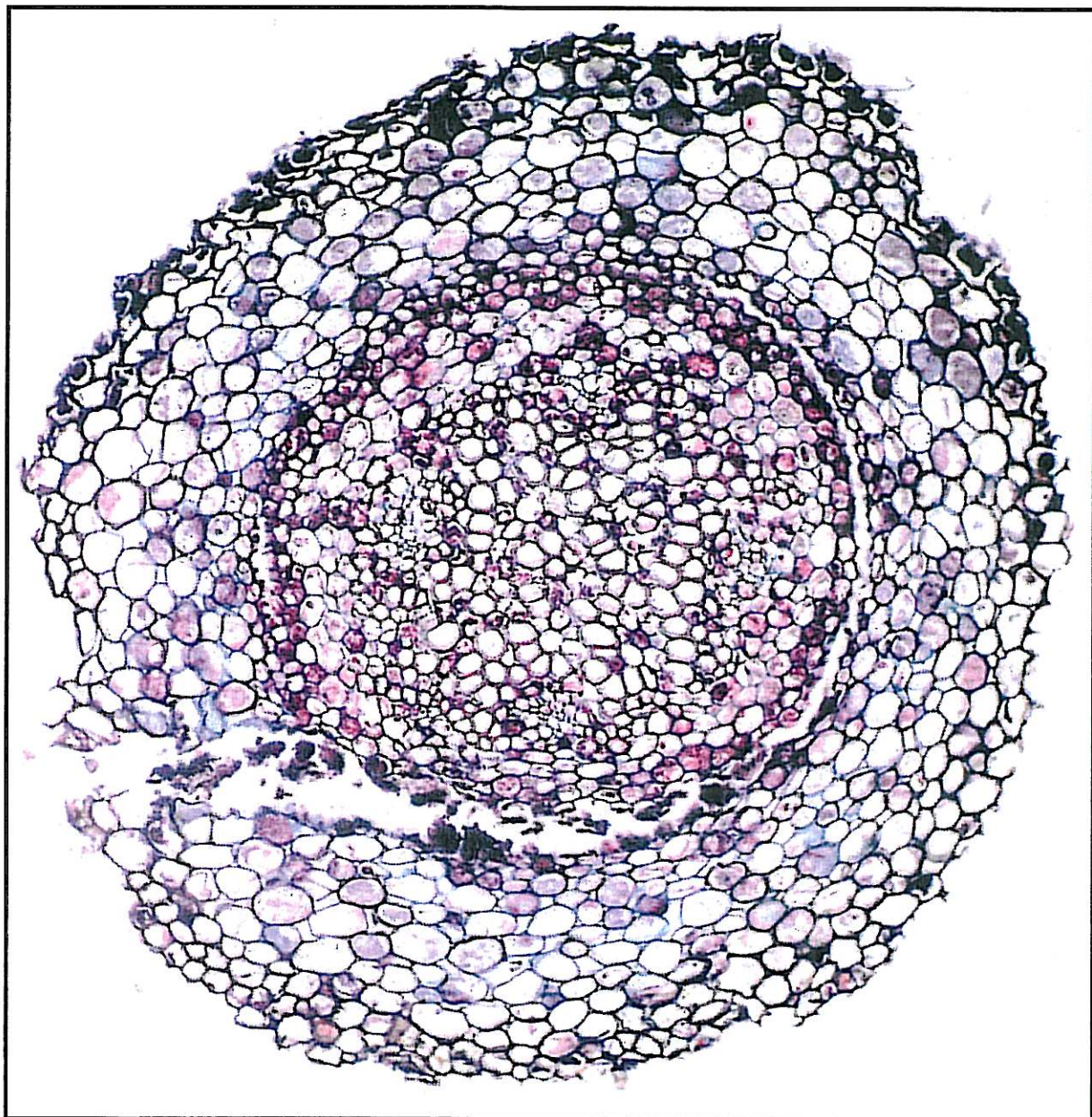
Obr. 11.- Příčný řez bází kořene druhu Drosera adelae (objektiv 20x, velikostně upraveno)



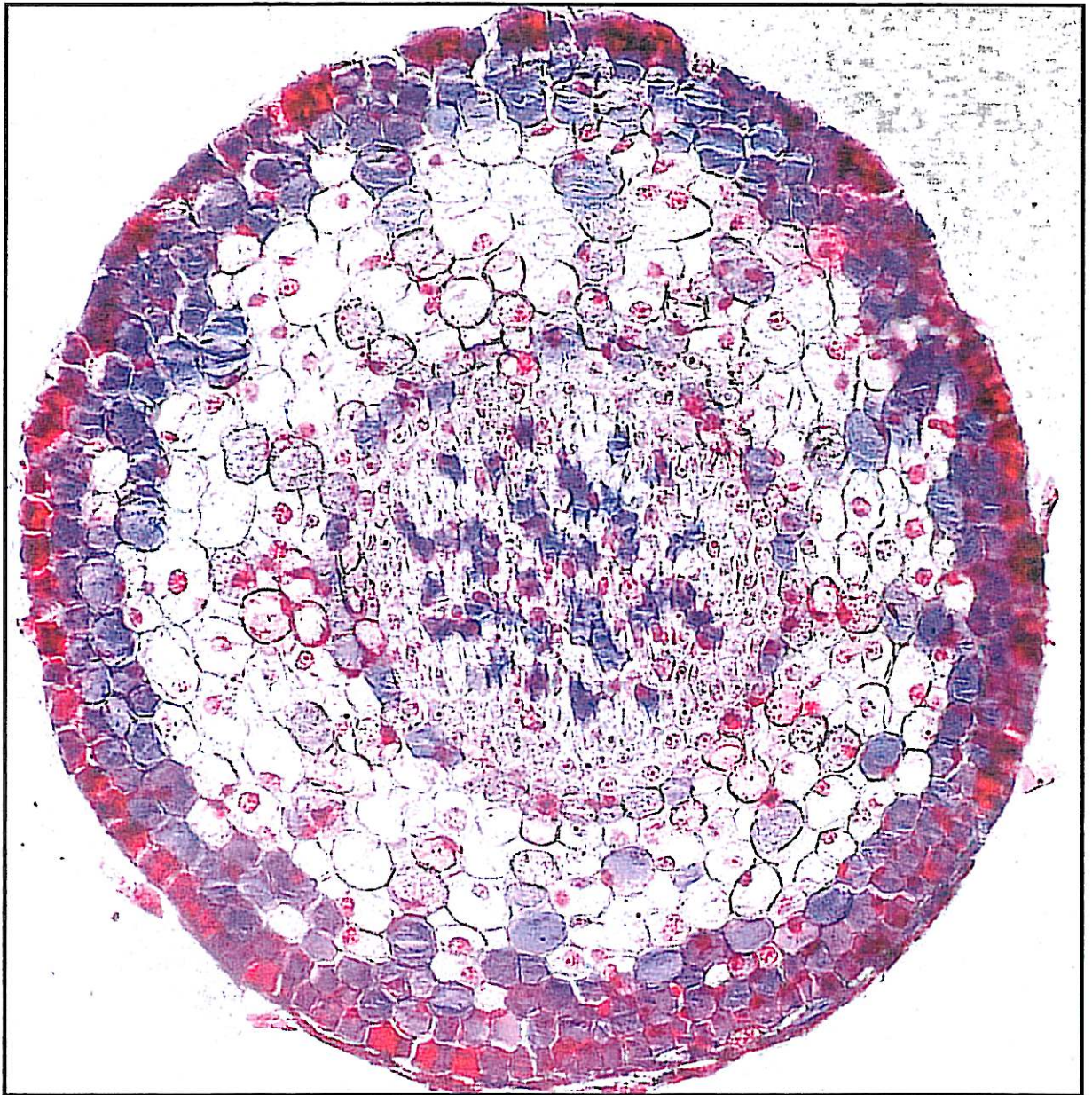
Obr. 12.- Příčný řez špičkou kořene druhu *Dionaea muscipula* (objektiv 20x, velikostně upraveno)



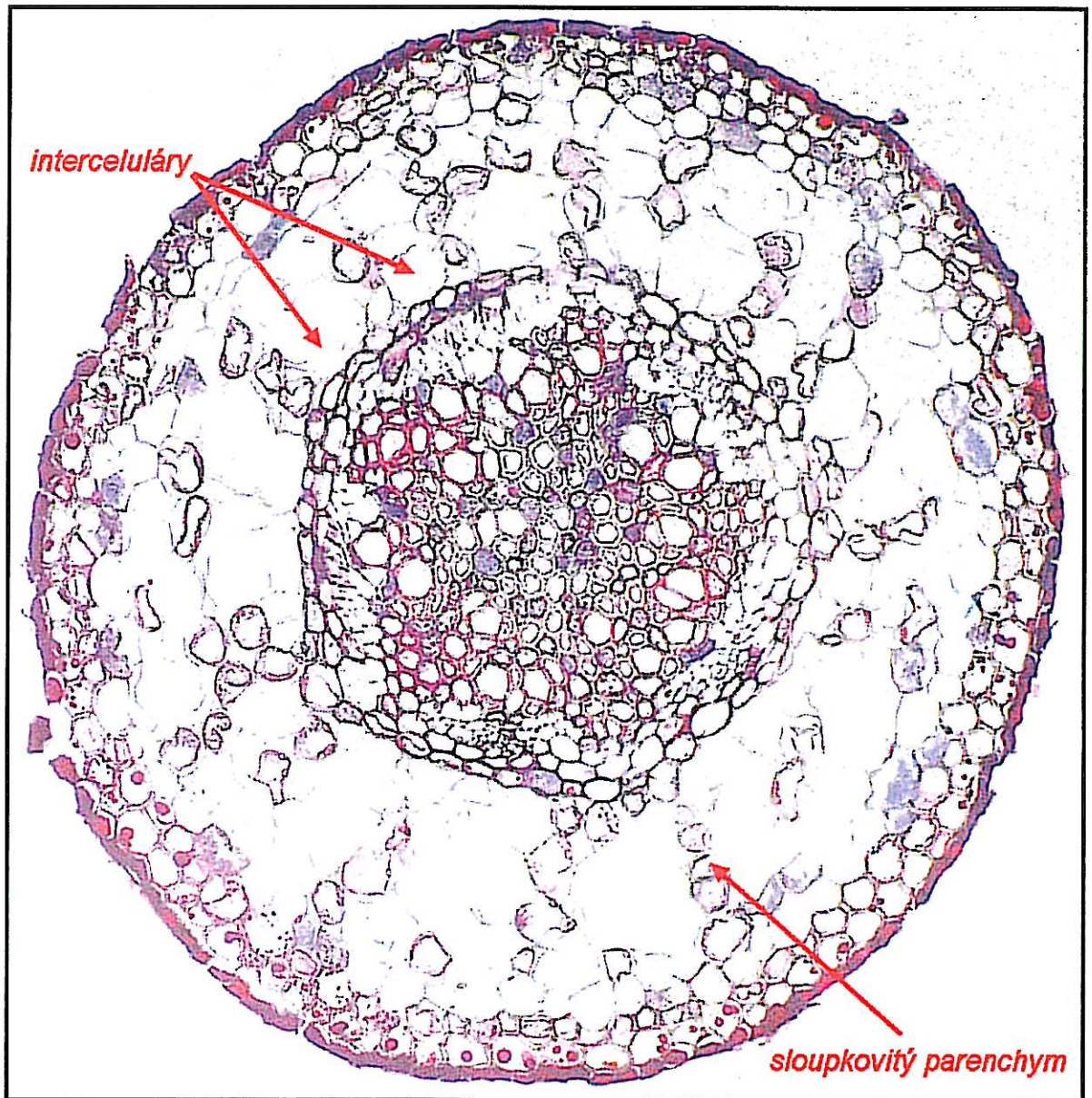
Obr. 13.- Příčný řez středem kořene druhu *Dionaea muscipula* (objektiv 10x, velikostně upraveno)



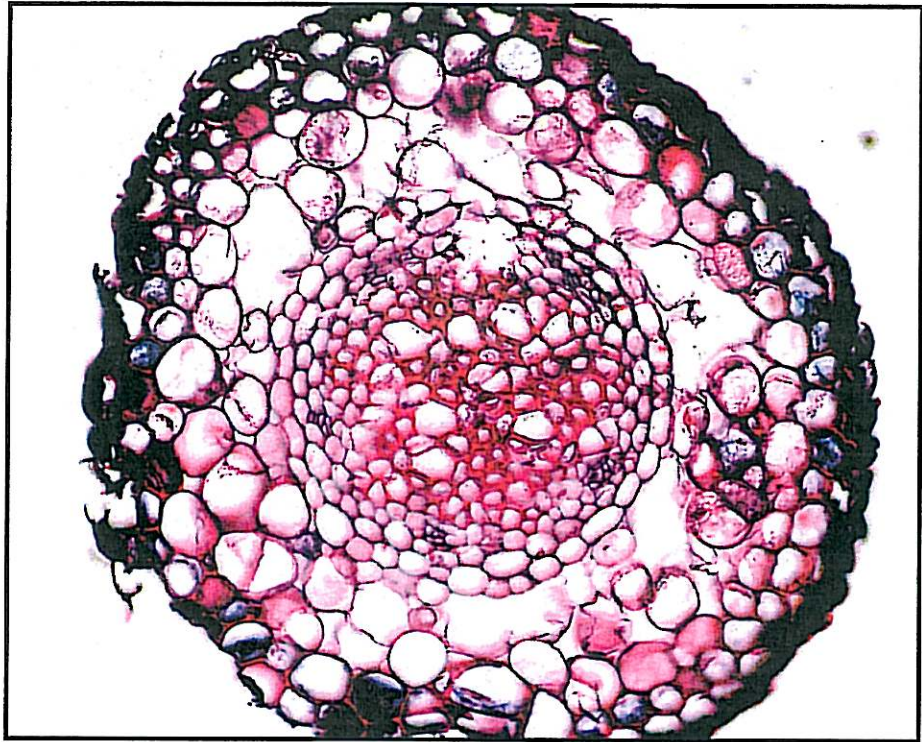
Obr. 14.- Příčný řez bází kořene druhu *Dionaea muscipula* (objektiv 10x, velikostně upraveno)



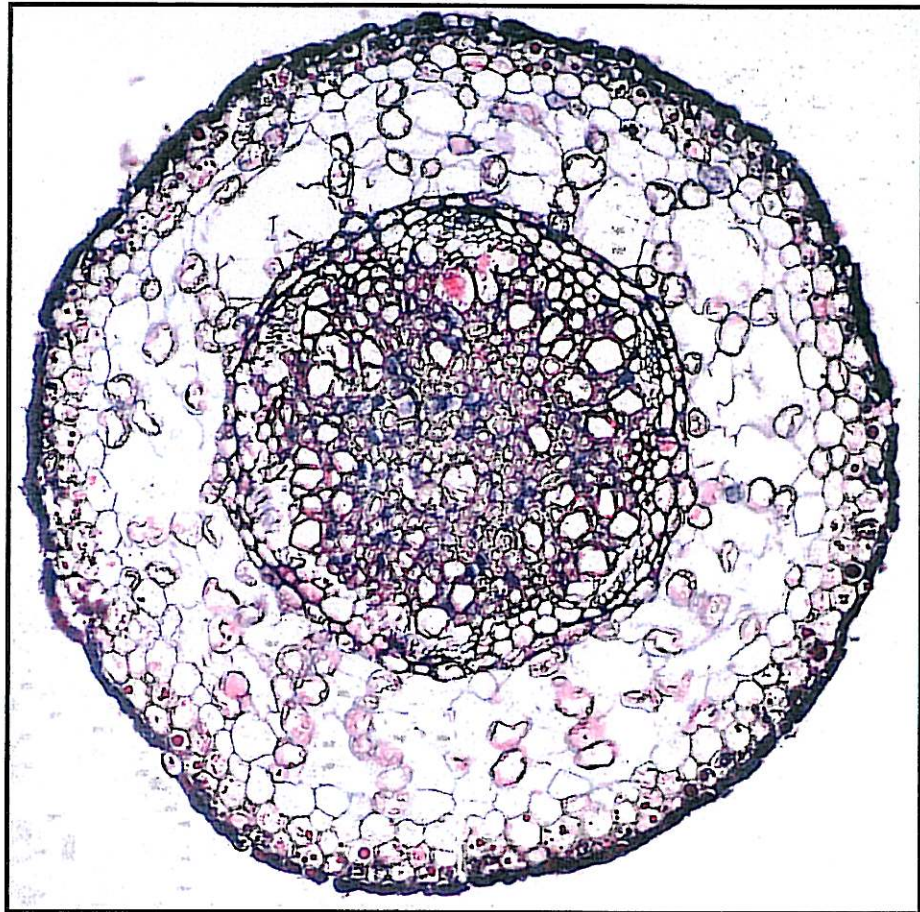
Obr. 15.- Příčný řez špičkou kořene druhu *Sarracenia rubra* (objektiv 20x, velikostně upraveno)



Obr. 16.- Příčný řez středem 1.kořene druhu *Sarracenia rubra* (objektiv 10x, velikostně upraveno)



Obr. 18.- Příčný řez středem 2. kořene druhu *Sarracenia rubra* (objektiv 10x, velikostně upraveno)



Obr. 19. Příčný řez středem 3. kořene druhu *Sarracenia rubra* (objektiv 10x, velikostně upraveno)