

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Jiří Namyslov

Diferenciace exodermis v podmínkách nedostatku živin, vliv fytohormonů

Exodermis differentiation under nutrient deficiency, effects of phytohormones

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

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

V Praze dne 13. 8. 2017

Jiří Namyslov

Poděkování

Rád bych poděkoval především RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za trpělivé vedení mé práce a za její cenné rady a připomínky podávané s nadměrnou ochotou a pečlivostí. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Aleši Soukupovi, Ph.D., celému laboratornímu týmu za trpělivost a své rodině, přátelům a Týně za psychickou podporu.

Obsah

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
Seznam použitých zkratk 9	9
1 Úvod.....	11
2 Literární úvod.....	13
2.1 Apoplastické bariéry.....	13
2.2 Modifikace buněčné stěny endodermis a exodermis.....	15
2.2.1 Casparyho proužky.....	15
2.2.2 Suberinové lamely.....	16
2.2.3 Terciárně ztloustlé buněčné stěny.....	17
2.3 Reakce kořenového systému na nedostatek živin.....	18
2.3.1 Role fytohormonů v regulaci růstu kořenového systému při nedostatku živin.....	19
2.3.2 Vliv deficiencie živin na plasticitu vývoje apoplastických bariér, role fytohormonů.....	24
3 Metodika.....	29
3.1 Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (hydroponická kultivace).....	29
3.1.1 Experiment 1. 1.....	29
3.1.1.1 Rostlinný materiál.....	29
3.1.1.2 Kultivace rostlin.....	29
3.1.1.3 Vyhodnocení vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté.....	31
3.1.1.3.1 Morfologická analýza kořenů.....	31
3.1.1.3.2 Anatomická analýza kořenů.....	31
3.1.2 Experiment 1. 2.....	32
3.2 Analýza vlivu lokálního nedostatku živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (kultivace „sendvičovou“ metodou).....	32
3.2.1 Experimenty 2.1. – 2.3.....	32
3.2.1.1 Rostlinný materiál.....	32
3.2.1.2 Kultivace rostlin.....	33

3.2.1.3	Vyhodnocení lokálního nedostatku živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté	35
3.2.1.3.1	Morfologická analýza	35
3.2.1.3.2	Anatomická analýza kořenů	36
3.2.1.4	Experiment 2. 1	36
3.2.1.5	Experiment 2. 2	36
3.2.1.6	Experiment 2. 3	36
3.3	Analýza vlivu fytohormonů na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté.....	37
3.3.1	Experiment 3.....	37
3.3.1.1	Rostlinný materiál	37
3.3.1.2	Vyhodnocení vlivu fytohormonů na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté	38
3.3.1.2.1	Morfologická analýza kořenů.....	38
3.3.1.2.2	Anatomická analýza kořenů	39
3.4	Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté s dodáním živiny na list	39
3.4.1	Experiment 4.....	39
3.4.1.1	Rostlinný materiál	39
3.4.1.2	Kultivace rostlin	39
3.4.1.3	Vyhodnocení vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté s dodáním živiny na list	40
3.4.1.3.1	Morfologická analýza	40
3.5	Statistické zpracování dat.....	40
4	Výsledky.....	41
4.1	Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (kultivace v hydroponii)	41
4.1.1	Experiment 1.1	41
4.1.1.1	Morfologická analýza kořenů.....	41
4.1.1.2	Anatomická analýza kořenů	43
4.1.2	Experiment 1.2.....	49
4.1.2.1	Morfologická analýza kořenů.....	49
4.1.2.2	Anatomická analýza kořenů	50
4.1.3	Shrnutí experimentu 1.1 a 1.2	55

4.2	Analýza vlivu lokálního nedostatku živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (kultivace „sendvičovou“ metodou)	56
4.2.1	Experiment 2. 1. - Kultivace celistvých rostlin mezi vrstvami agaru K/N ..	56
4.2.2	Experiment 2. 2. - Kultivace celistvých rostlin mezi vrstvami agaru K/N a K/K s podrobným hodnocením frekvence výskytu apoplastických bariér	57
4.2.3	Experiment 2. 3. - Kultivace rostlin (s obilkou/bez obilky) mezi vrstvami agaru K/N a K/K.....	61
4.3	Analýza vlivu fytohormonů na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté.....	63
4.3.1	Experiment 3.....	63
4.3.1.1	Morfologická analýza kořenů.....	63
4.3.1.2	Anatomická analýza kořenů	64
4.4	Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté s dodáním živiny na list	68
5	Diskuze	69
5.1	Vliv deficiencie různých živin na postup diferenciaci exodermis a endodermis	70
5.1.1	Existuje korelace mezi biometrickými charakteristikami kořene a postupem diferenciaci exodermis a endodermis?	72
5.2	Vliv lokálního nedostatku živin	73
5.3	Vliv nedostatku jednotlivých živin s dodáním živiny na list	74
5.4	Vliv fytohormonů na rychlost diferenciaci exodermis	75
6	Závěr.....	77
7	Seznam použité literatury	78

Abstrakt

Apoplastické bariéry (exodermis a endodermis) slouží především k regulaci volného pohybu látek apoplastem, čehož je dosaženo modifikacemi buněčných stěn. Diferenciace těchto bariér je do jisté míry variabilní. Bylo mnohokrát dokázáno, že diferenciace apoplastických bariér v kořeni je silně ovlivněna nepříznivými podmínkami prostředí. Řada stresových faktorů urychluje ukládání apoplastických bariér. Tato práce se zabývá vztahem mezi dostupností živin a vývojem bariér v kořeni a také mechanismy koordinace vývojových procesů v kořenech, včetně zapojení auxinu a dalších fytohormonů v koordinaci těchto procesů. Zkoumá se zde plasticita vývoje exodermis u kukuřice seté (*Zea mays* L.) rostoucí v podmínkách deficientních na různé prvky. Kořeny rostoucí v podmínkách deficiencie vykazují morfologické rozdíly na úrovni délky hlavních kořenů i větvení. Nejdůležitější výsledky přináší anatomická analýza, která ukazuje výrazné urychlení diferenciace exodermis i endodermis při deficienci N a P na naopak zpomalení diferenciace při nedostatku Fe a K. Tento efekt je zřejmě výsledkem systémové nikoli lokální reakce kořenového systému, protože nebyl pozorován při lokalizovaném působení deficiencie. Práce také sleduje vliv některých přidaných fytohormonů na vývoj apoplastických bariér, kdy ABA nejvíce urychlila diferenciaci bariér a aplikace NAA ji naopak zpomalila.

Klíčová slova: exodermis, kukuřice, deficiencie živin, fytohormony

Abstract

Apoplastic barriers (exodermis and endodermis) control free movement of substances by apoplast, which is achieved by specific cell wall modifications. Differentiation of these barriers is to some extent variable. It has been demonstrated many times that the differentiation of root apoplastic barriers is strongly influenced by unfavourable environmental conditions. Many stress factors accelerate the deposition of apoplastic barriers. This work deals with the relationship between availability of nutrients and development of root barriers and mechanisms of coordination of developmental processes in roots, including the involvement of auxin and other phytohormones in the coordination of these processes. The exodermis developmental plasticity is followed in maize (*Zea mays L.*) under conditions of various nutrient deficiencies. The most important results are presented by anatomical analysis, which shows a significant acceleration of exodermis and endodermis differentiation in the N and P deficiency on the contrary, the slowing of differentiation in the absence of Fe and K. This effect is apparently a result of systemic rather than local root system responses because it was not observed with localized deficiency. This thesis also test the influence of some phytohormones on the development of apoplastic barriers, when ABA accelerated the barrier differentiation and the NAA application slowed it down.

Key words: exodermis, maize, nutrient deficiency, phytohormones

Seznam použitých zkratk

- 4-Cl-IAA – 4 – Chlorindol – 3 – octová kyselina
ABA – kyselina abscisová
ACC – 1 – aminocyklopropan – 1 – karboxylová kyselina
AFS – zdánlivý volný prostor (Apparent Free Space)
AVG – Aminoethoxyvinylglycin
CASPs – proteiny domény Casparyho proužku (Casparian Strips Domain Proteins)
CIF 1, 2 – z angl. Casparian Strip Integrity Factor 1, 2
CP – Casparyho proužek
cPTIO - 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CSD – membránová doména Casparyho proužku (Casparian Strip Membrane Domain)
CTR 1 – z angl. Constitutive triple response 1
DFS – Donnanův volný prostor (Donnan Free Space)
EIN2 – z angl. Ethylene insensitive 2
ESB1 – z angl. Enhanced Suberin 1
ETR 1 – z angl. Ethylene response 1
IAA – Indol – 3 – octová kyselina
IBA – Indol – 3 – máselná kyselina
IRT 1 – z angl. Iron-regulated Transporter 1
LRR – RLK – z angl. Leucine rich Receptor Like Kinase
NAA – Naftalen – 1 – octová kyselina
NPA – 1-N-naftylftalamová kyselina
PER 64 – peroxidáza 64
PIN – PIN-FORMED
RBOHF, B, D – z angl. Respiratory Burst Oxidase Homolog F, B, D
ROS – reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SGN4 – Schengen4, gen identický s RBOHF
SL – Suberinová lamela
TIBA – 2,3,5-trijodbenzoová
TIR1 – z angl. Transport inhibitor response 1
UV – ultrafialové záření
WFS – vodný volný prostor Water Free Space

1 Úvod

Tato diplomová práce zčásti navazuje na bakalářskou práci zabývající se mechanismy vývoje apoplastických bariér. Obě tyto práce byly vypracovány v laboratoři Fyziologické anatomie rostlin.

Látky se mohou v kořeni rostlin pohybovat radiálním směrem dvěma hlavními způsoby, apoplastem nebo symplastem. Symplastický pohyb jde napříč buňkami, dostává se přes buněčnou stěnu a setkává se s cytoplazmou. Naproti tomu apoplastický pohyb probíhá buněčnými stěnami a nedostává se do cytoplazmy. Exodermis a endodermis jsou apoplastické bariéry se specifickými modifikacemi buněčných stěn. Slouží hlavně k regulaci volného pohybu látek apoplastem, čímž dokážou zároveň regulovat příjem vody a živin. Brání také přístupu nežádoucích látek nebo patogenů dostávajících se do vnitřních pletiv kořene (Enstone et al. 2003). Endodermis je hlavní bariérou regulující pohyb látek do středního válce. Buňky endodermis tvoří ve své ekvatoriální oblasti opaskovité struktury, tzv. Casparyho proužky (CP), které vznikají ukládáním ligninu do buněčné stěny (Esau 1953). CP se formují v první fázi vývoje endodermální buňky. Druhým stádiem je pak ukládání suberinových lamel na celé ploše tangenciálních, radiálních a příčných buněčných stěn. V poslední fázi dochází k ukládání sekundární buněčné stěny. Modifikace buněčných stěn jsou typické především pro endodermis, ale vyskytují se také ve vnější vrstvě primární kůry – hypodermis, která se v tomto případě nazývá exodermis (Geldner 2013, Enstone et al. 2003). Exodermis je funkčně méně specifická než endodermis, někdy bývá i vícevrstevná a ve svém vývoji je mnohem více plastická. Z vybraných 200 krytosemenných rostlin měla velká většina z nich (90,5%) vyvinutou exodermis s CP (Hose et al. 2001, Peterson and Perumalla 1990). CP zde brání pohybu látek z půdy do kořene nebo např. ztrátám vody z kořene. Zatímco endodermis je klíčovou apoplastickou bariérou, exodermis má především funkci přídatné ochranné bariéry a díky své lokalizaci pod pokožkou chrání pletiva primární kůry.

Pokud by zesílení apoplastických bariér vedlo k vyšší odolnosti rostlin na stres, bylo by možné vybírat rostlinné druhy, které přežijí na méně příznivých místech. A šlechtit obilniny s modifikovaným vývojem exodermis a tudíž s větší odolností proti stresu a patogenům (Husakova 2008). Z hlediska působení různých stresů (sucho, salinita, toxicita) byl vývoj exodermis prozkoumán podrobně a tyto práce ukazují urychlení diference exodermis za stresových podmínek (Krishnamurthy and Vissing-Jorgensen

2011, Krishnamurthy et al. 2009, Armstrong and Armstrong 2001). Nicméně většina dosavadní zjištění týkající se vývoje apoplastických bariér pod vlivem deficience živin platí pouze pro endodermální vrstvu. Tato práce je proto prováděna na modelovém organismu kukuřice seté (*Zea mays L.*), kultivaru Cefran, neboť tato rostlina na rozdíl od *Arabidopsis* tvoří i exodermis. Cílem této diplomové práce je charakterizovat vliv deficience minerálních živin na tvorbu exodermis v hlavním kořeni a testovat vliv vybraných fytohormonů na utváření exodermis. Konkrétní cíle práce jsou následující.

Cíle práce:

1. Zjistit vliv deficience jednotlivých živin na diferenciaci exodermis.
2. Ověřit zda deficience živiny může mít lokální působení na exodermis.
3. Testovat roli vybraných fytohormonů v působení na exodermis.
4. Otestovat účinek dodání živiny na list rostliny v deficientním médiu.

2 Literární úvod

2.1 Apoplastické bariéry

Transport látek v kořeni může probíhat dvěma cestami, apoplastickou a symplastickou cestou. Apoplastický pohyb probíhá buněčnými stěnami a není v kontaktu s cytoplazmou. Naproti tomu symplastický pohyb jde napříč buňkami spojenými plasmodesmy. Látky se dostávají přes plazmatickou membránu a setkávají se s cytoplazmou (Taiz and Zeiger 2010, Haberlandt 1884).

Kořenový apoplast, respektive jeho část je tvořena mikrokapilárními prostory v buněčných stěnách kořenových buněk, je tedy část rostlinného těla, která se první setkává s nepříznivými chemickými podmínkami půdy, jako jsou například vysoké koncentrace Na^+ nebo Al^{3+} iontů (Sattelmacher 2001). Pro apoplast buněčné stěny byl zvolen pojem „zdánlivý volný prostor“ (AFS, apparent free space), aby se zdůraznilo, že pohyb iontů není zcela volný, ale závisí na jejich interakci s fixními anionty buněčné stěny, především karboxylovými skupinami pektinů. Podle autorů (Briggs and Robertson 1957) je AFS rozdělen na Donnanův volný prostor (DFS, Donnan free space), kde při průchodu iontů dochází k interakci s fixními anionty buněčné stěny a vodný volný prostor (WFS, Water Free Space), kde k interakci nedochází. Striktní oddělení DFS a WFS je ale spíše jen zjednodušením, protože není možné provést jasné oddělení obou prostorů (Starrach and Mayer 1986).

Pohyb látek prostorem buněčné stěny je neregulovaný, pouze může docházet k sorpci iontů na fixní anionty. Množství aniontů buněčné stěny lze vyjádřit kationtovou výměnnou kapacitou (cation exchange capacity, CEC). CEC buněčné stěny není konstantní, ale silně reaguje na faktory prostředí. Například salinita obecně snižuje CEC (Bigot and Binet 1986, Sattelmacher 2001) CEC může do jisté míry ovlivnit přítomnost iontů u plazmatické membrány a s tím i jejich příjem. Odpověď rostliny je tedy ovlivněna chemickými podmínkami v apoplastu a následně vlastnosti apoplastu ovlivňují minerální výživu. Bylo např. popsáno, že vzrůstající CEC koreluje s větším podílem sorbovaných bivalentních kationtů (Ca^{2+} a Mg^{2+}) oproti monovalentním (K^+ , Na^+). To by mohlo vysvětlovat mezidruhové rozdíly v poměru sorbovaného K: Ca (Haynes 1980). Složení buněčných stěn a jejich případné modifikace vznikající během diferenciaci kořenových buněk také ovlivňují příjem živin, jako je Zn nebo Cu, jenž jsou preferenčně přijímány v iontové oproti chelatované podobě (Marschner and Römheld 1995). To může souviset

nejen se sorpcí iontů v buněčné stěně ale i s omezenou pohyblivostí relativně velkých molekul chelátů póry buněčné stěny. CEC ovlivňuje také toleranci vůči zasolení či toxickým iontům, například Cd^{2+} nebo Al^{3+} (Marzadori et al. 1996).

Apoplastické bariéry jsou vrstvy buněk, ve kterých dochází ke specifickým modifikacím buněčné stěny, zamezujícím volnému průchodu vody a iontů apoplastem. Dokážou tak zajistit selektivitu transportu, protože látky musí pro svůj další pohyb přejít přes plazmatickou membránu do symplastu. Apoplastické bariéry tak brání přístupu nežádoucích látek nebo patogenů do vnitřních pletiv kořene a zároveň nekontrolovanému unikání látek opačným směrem. Nejdůležitější apoplastická bariéra kořene je nejvnitřnější vrstva primární kůry nazývaná endodermis (Enstone et al. 2003, Kroemer 1903, Esau 1953, van Fleet 1961). Apoplastické bariéry se tvoří také ve vnější vrstvě primární kůry hypodermis, která se nazývá exodermis, pokud její buňky diferencují CP. Exodermis je proto specializovaným typem hypodermis s funkcí apoplastické bariéry velmi podobné endodermis. Exodermis oproti endodermis vykazuje mnohem vyšší vývojovou plasticitu. Většina rostlinných druhů vytváří exodermis. Z 200 druhů krytosemenných rostlin měla vyvinutou exodermis velká většina z nich (90,5%). Chybí ale u nahosemenných rostlin a výtrusných cévnatých rostlin s výjimkou některých vranečků (Peterson and Perumalla 1990, Hose et al. 2001) Stejně jako endodermis, funguje exodermis jako selektivní apoplastická bariéra pro vodu a soluty, bránící přímému toku z půdy do kořene (Enstone et al. 2003). Tato vrstva však není absolutní bariérou pro difuzi živin (Sattelmacher 2001) ani pro průtok vody, což bylo ukázáno u kukuřice (*Zea Mays* L.) nebo rýže (*Oryza sativa* L.), (Zimmermann and Steudle 1998, Ranathunge et al. 2003). V případě rýže (*Oryza sativa* L.) bylo dokázáno, že jsou tyto bariéry částečně obcházeny např. Na^+ ionty, které takto vstupují do stonku. Zvýšené ukládání hydrofobního alifatického suberinu v apoplastických bariérách u rostlin vystavených mírnému stresu 100 mM NaCl pak vedlo k lepšímu přežití rostlin ve vysokém zasolení (Krishnamurthy and Vissing-Jorgensen 2011). Toto zvýšené ukládání v nepříznivých podmínkách prostředí snižuje hydraulickou vodivost kořene (Cruz et al. 1992, Steudle 1994, Kramer and Boyer 1995, Steudle and Peterson 1998, Zimmermann et al. 2000).

Vysvětlení výše zmíněných pozorování souvisí s tím, že apoplastické bariéry nejsou v kořeni kontinuální po celé jeho délce. Především nejsou diferencované v kořenových špičkách, diferencují postupně v určité vzdálenosti za kořenovou špičkou a tato vzdálenost je ovlivněna podmínkami prostředí (Zeier et al. 1999, Karahara et al. 2004,

Peterson 1992). A také jsou přerušeny v zóně, kde vznikají laterální kořeny pronikající primární kůrou a tím vytvářejí „okénka“ pro pronikání látek do pletiv kořene (Haynes 1980, Yeo et al. 1987, Tandy et al. 2006, Peterson et al. 1981, Ranathunge et al. 2004, Soukup et al. 2002, Soukup et al. 2004, Faiyue et al. 2010) Ovšem nedochází zde k úplně nekontrolovanému pohybu látek do středního válce, neboť se nad prorůstajícím primordiím vytváří suberinizovaná vrstva a buňky primární kůry v jeho okolí mohou lignifikovat (Soukup et al. 2002, Li et al. 2017).

2.2 Modifikace buněčné stěny endodermis a exodermis

Funkce apoplastických bariér je umožněna specifickými modifikacemi buněčné stěny buněk těchto vrstev. Proto budou v následujícím textu stručně charakterizovány. Endodermální/exodermální buňky prodělávají tři stádia postupného vývoje: vznik Casparyho proužků, uložení suberinových lamel a uložení sekundární stěny. Nicméně druhé a třetí stádium nemusí nastat vždy (Perumalla and Peterson 1986, Clarkson et al. 1987, Barnabas and Peterson 1992, Geldner 2013).

2.2.1 Casparyho proužky

CP jsou opaskovité struktury, tvořící se v centru transverzálních a antiklinálních buněčných stěn endodermálních a exodermálních buněk (Kroemer 1903, Caspary 1865). Jsou to oblasti buněčné stěny, lokalizované paralelně s povrchem kořene, ve kterých dochází k ukládání ligninu, případně suberinu (Esau 1953, Kroemer 1903). CP v buňkách přehrazují apoplastický prostor a tím, že jsou pevně spojeny s plazmalemou, fyzicky brání difúzi solutů z extracelulárního prostoru do stéle. Zároveň tyto apoplastické bariéry také zabraňují zpětnému toku iontů a vody ze stéle do primární kůry (Esau 1953, Enstone et al. 2003, Geldner 2013). CP jsou tvořeny převážně ligninem, doplněným o malé množství suberinu. V pracích na různých rostlinných druzích se ukázalo, že lignin je pro tvorbu velmi důležitý (Zeier et al. 1999) a suberin zřejmě nemusí být pro diferenciaci funkčních CP vůbec potřebný (Naseer et al. 2012). Komplikace, s určením významu suberinu pro tvorbu CP, způsobuje podobnost mezi ligninem a aromatickou doménou suberinu, kdy je obtížné tyto polymery od sebe jednoznačně odlišit. Množství suberinu v endodermis může být navíc u každého rostlinného druhu jiné a měnit se během růstu kořenů (Zeier et al. 1999).

Lignin je racemický heteropolymer, který se skládá ze tří aromatických hydroxyskořicových alkoholů (kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol).

Syntéza těchto alkoholů probíhá v cytoplazmě, následně jsou alkoholy za pomoci peroxidáz a lakáz v prostoru buněčné stěny přeměněny na radikály a polymerizují. Ligninové monomery jsou do struktury ligninu spojeny etherovými vazbami (Boerjan et al. 2003). Polymerizaci ligninu zprostředkovávají „dirigent“ proteiny, které řídí uspořádání monomerů ve vznikajícím polymeru (Davín and Lewis 2000, Boerjan et al. 2003, Hatfield and Fukushima 2005). Jedním z nejdůležitějších „dirigent“ proteinů v endodermis je ENHANCED SUBERIN 1 (ESB1) sekretovaný k lokalizaci do CP. Ztráta funkce ESB1 v *esb1-1* mutantu vede ke ztrátě dobře organizované struktury CP, čímž je lignifikace endodermálních CP narušena. Zhoršená funkce bariéry je u tohoto mutantu stimulací ukládání suberinu (Baxter et al. 2009).

Hlavním genem zajišťujícím lokalizaci CP je *CASPARIAN STRIP DOMAIN PROTEIN 1* (*CASP1*) z rodiny CASP (Molina et al. 2009, Bernards 2002). CASP proteiny jsou asociovány s formací membránové domény CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN (CSD) zakládající CP, nad kterou pak dochází k uložení ligninu (Alassimone et al. 2010, Roppolo et al. 2014). Pro správnou lokalizaci ESB1 je nutná přítomnost CASP1 proteinu. Naopak ztráta ESB1 narušuje lokalizaci CASP1 v membránové doméně CP (Hosmani et al. 2013). Dalším účastníkem v procesu lignifikace CP je specifická NADPH oxidáza SGN4/RBOHF. Mutant *sgn4/rboh*f má velmi silně zpožděnou tvorbu apoplastických bariér, i když nemá narušenou lokalizaci CASP proteinů. První genetický důkaz role peroxidáz v tvorbě CP ukázala specifická peroxidáza PER64, která pro správnou lokalizaci do CSD vyžaduje proteiny CASP (Lee et al. 2013). Pro lokalizaci CASP proteinů do CSD je také potřeba účasti SCHENGEN3 (SGN3), což je leucin-rich receptor-like kináza (LRR-RLK) lokalizována kolem formující se CSD v plazmalemě (Pfister et al. 2014). Tuto kinázu aktivuje peptidový ligand CIF1,2 (CASPARIAN STRIP INTEGRITY FACTOR 1,2), který se pohybuje směrem ze středního válce a umožňuje tak kontrolu integrity vznikající apoplastické bariéry (Doblas et al. 2017).

2.2.2 Suberinové lamely

Po diferenciaci CP se buňka dostává do fáze, ve které nedochází k dalším velkým vývojovým změnám. V této fázi může buňka zůstat, nebo se dále diferencovat a přejít do sekundární fáze vývoje, kterou je ukládání suberinové lamely (Geldner 2013, Perumalla and Peterson 1986, Barnabas and Peterson 1992, Clarkson et al. 1987, Robbins et al. 2014). Biopolymer suberin je složený z polyalifatických polyesterů glycerolu, které

jsou propojené s fenoly a přídavnými vosky. Struktura SL pod transmisním elektronovým mikroskopem vytváří střídavě světlé a tmavé pruhy (Bernards 2002). Suberin je složen z velmi dlouhých řetězců mastných kyselin a alkoholů, krátkých esterifikovaných hydroxyskořicových kyselin a glycerolu. Toto složení dovoluje extensivní polymeraci a může vést k tvorbě rozvětvených, nebo lineárních polymerů s vysokou molekulovou hmotností. Tento lipidový polyester je hydrofobní a velmi rezistentní k enzymatické a chemické degradaci (Geldner 2013, Ranathunge et al. 2011, Pollard et al. 2008, Meyer et al. 2011b, Perumalla and Peterson 1986).

Suberinovou lamelu (SL) tvoří hydrofobní vrstva suberinu a přídavných vosků, které se ukládají mezi buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu po celém buněčném povrchu, s výjimkou oblastí plazmodezmů (Geldner 2013). Na rozdíl od exodermis, kde k tvorbě lamel dochází krátce po vzniku CP, v endodermis je mezi dokončením tvorby proužků a začátkem ukládání SL časová prodleva (Enstone and Peterson 1997). Na ukládání suberinu mají vliv i okolní podmínky prostředí (Zimmermann et al. 2000, Hose et al. 2001). SL omezují průtok vody skrz aquaporiny tím, že brání jejímu přístupu k membránám (Tyerman et al. 1999). Jsou sice méně účinné pro blokaci apoplastického transportu mezi endodermálními buňkami, ale dobře blokují, nebo redukují transport živin, vody a případně patogenů přes plazmalemu do buňky (Geldner 2013). V endodermální vrstvě se do sekundární fáze nejprve diferencují buňky obvykle blízké floémovým pólům (Peterson and Enstone 1996). Naopak buňky, ve kterých se SL ukládají výrazně později, nebo se neukládají vůbec, jsou nazývány „propustné buňky“ a leží většinou naproti xylémovým pólům. Tyto endodermální buňky, mají vyvinuté pouze CP a díky tomu jsou více propustné pro příjem iontů do stélé. Počet propustných buněk postupně klesá s růstem kořene a ve starších částech kořene se nemusí vyskytovat vůbec (Geldner 2013, Enstone et al. 2003, Peterson and Enstone 1996, Cholewa and Peterson 2004). U exodermálních buněk podobné určení pozice propustných buněk vůči jiným pletivům pozorováno nebylo (Peterson and Enstone 1996, Hose et al. 2001).

2.2.3 Terciárně ztloustlé buněčné stěny

Poslední možnou modifikací je ukládání sekundární buněčné stěny mezi plazmalemu a primární buněčnou stěnu se suberinovou lamelou. Jde o terciární fázi vývoje apoplastických bariér, při které dochází k vrstevnatému ukládání sekundární stěny tvořené převážně z celulózy, která může být později impregnována ligninem, složením se

podobajícímu ligninu v CP jednoděložných rostlin (Zeier and Schreiber 1998, Schreiber et al. 1999). Suberin je zde zastoupen ve velmi malém množství nebo často úplně chybí (Enstone et al. 2003). Terciárně ztloustlé buněčné stěny se nejčastěji vytváří na periklinální a radiální straně buněk, což se na příčném řezu kořenem jeví jako struktura ve tvaru „U“ (Geldner 2013, Zeier and Schreiber 1998, Northcote et al. 1989). V primární i sekundární buněčné stěně je celulózová/hemicelulózová síť tvořena mikrofibrilami a mezibuněčnými prostory, které se liší velikostí mezi 3,5 a 5 nm (Carpita et al. 1979, Gogarten 1988, Chesson et al. 1997) a tudíž nepředstavuje hlavní difuzní bariéru ani pro větší molekuly. Ale v důsledku tření může být rychlost toku omezena. Velikost pórů brání transportu částicím s vysokou molekulární hmotností, jako například kyselině šťavelové, fytochelatinům nebo virům (Sattelmacher 2001). Hlavní funkcí U-ztlustlin je tedy zřejmě mechanická opora. Ukládání sekundární buněčné stěny bylo zatím zkoumáno převážně v souvislosti s diferenciací v xylému, nebo se sekundárním tloustnutím u dřevin i bylin, včetně *Arabidopsis* (Chaffey et al. 2002), proto o molekulárních mechanismech řídicích ukládání sekundární stěny v endodermis či exodermis existuje minimum informací.

2.3 Reakce kořenového systému na nedostatek živin

Kořen je plastický orgán s vysokou schopností diferenciaci. Existuje mnoho strategií, jak dokáže reagovat na stresové faktory, nebo na změny podmínek okolního prostředí. Nedostatek živin ovlivňuje morfologii kořenů, zejména jejich hmotnost, průměr, povrch a rozvětvení. Důležitou reakcí je zvětšení plochy kořene pomocí zvýšeného růstu kořenových vlásků (Nibau et al. 2008). Tvorba postranních kořenů je důležitá pro efektivní získávání fosforu z media, což bylo ukázáno např. u kukuřice (*Zea mays* L.) (Zhu and Lynch 2004). A celkové zvýšení poměru kořenové biomasy ve srovnání s nadzemní částí rostlin nastává především při deficienci fosforu (Atkinson 1973, Anghinoni and Barber 1980). Rostlina také dokáže ovlivňovat chemismus okolní rhizosféry tím, že vylučuje protony a různé organické kyseliny pro změnu pH nebo fytochelatinu k vychytávání látek vázaných v půdě (Rauser 1995). K efektivnějšímu příjmu deficientních prvků jsou v buňkách kořene ve zvýšené míře exprimovány geny kódující vysokoafinitní transportéry živin (Misson et al. 2004). Tyto transportéry navíc často vykazují i polarizovanou lokalizaci v rámci centrálně-periferně polarizované domény plazmatické membrány, tj. najdeme je lokalizované pouze v distální (příp. proximální) doméně membrány podle směru transportu (Geldner et al. 2003), což bylo popsáno např. pro transportéry křemíku (Ma et al. 2007) nebo boru (Takano et al. 2010).

Pro efektivní příjem a asimilaci dusíku a fosforu je rostlina schopna symbiózy s půdními mikroorganismy (Torrey 1978).

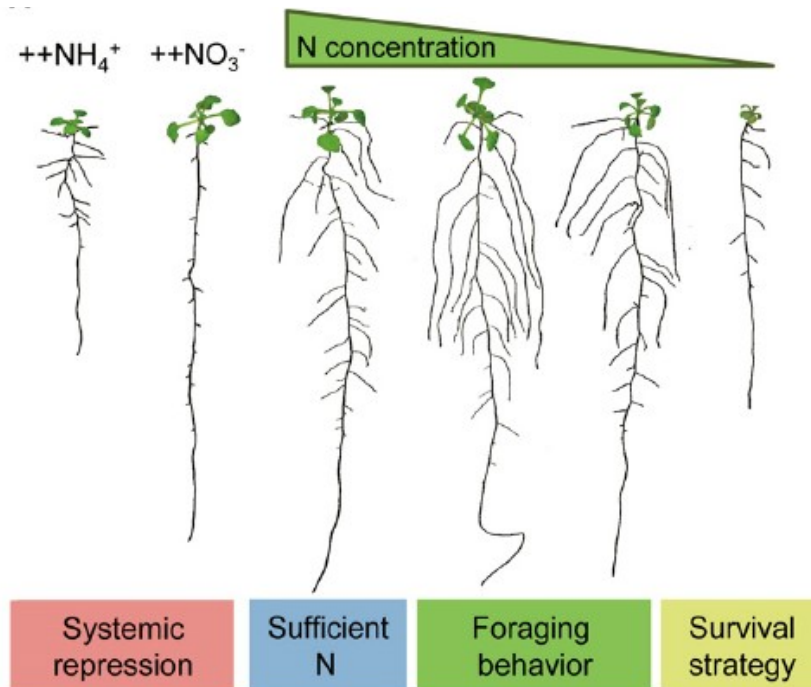
Z hlediska tématu diplomové práce je nicméně zajímavý především fakt, že byla kromě výše zmíněných mechanismů recentně popsána také schopnost rostliny reagovat na změny dostupnosti živin změnou v rozsahu diferenciaci endodermis, která je zřejmě zprostředkována některými fytohormony, především ethylenem a kys. abscisovou (Barberon et al. 2016). Také některé starší práce popisují, že se při nedostatku dusíku, fosforu a síry snížila hydraulická vodivost kořenů (Clarkson et al. 2000, Radin and Matthews 1989). Vzhledem k tomu, že se tato práce věnuje vlivu deficiencie živin na diferenciaci exodermální vrstvy, budou v následujícím textu shrnuty dostupné informace týkající se změn vnitřní struktury kořene v reakci na nedostatek živin. Dále budou shrnuty informace o roli fytohormonů v regulaci růstu kořenů při nedostatku živin.

2.3.1 Role fytohormonů v regulaci růstu kořenového systému při nedostatku živin

Existuje mnoho endogenních faktorů, které se podílejí na růstu a vývoji kořene a regulaci utváření architektury kořenového systému nejen v odpovědi na nedostatek živin. Významnou roli hrají fytohormony (Nibau et al. 2008). Jako první můžeme jmenovat auxin. Auxin se díky svému komplexnímu působení považuje za jeden z nejdůležitějších rostlinných hormonů. Jeho název pochází z řeckého *auxein*, což znamená prodlužovat se (Taiz and Zeiger 2010). Ve vyšších rostlinách se nejvíce vyskytuje kyselina indol-3-octová IAA, je to strukturně celkem jednoduchý derivát indolu, který se řadí do skupiny přírodních auxinů společně s 4-Cl-IAA (kyselina 4-chloroindol-3-octová) a IBA (kyselina indol-3-máselná). Ze syntetických forem auxinu je pro studium nejpoužívanější 1-NAA (kyselina naftalen-1-octová) (Copes and Mandel 2000, Weijers et al. 2018).

U rostlin v běžných růstových podmínkách se ukázalo, že IAA se silně zapojuje při větvení kořenů (Benkova and Bielach 2010). Transport auxinu v kořeni a existence lokálních auxinových maxim je nezbytná pro regulaci elongace kořenů, větvení i tropismy kořene (Zažímalová et al. 2007, Friml 2003). Také v regulaci odpovědi kořenového systému na nedostatek živin je auxin významně zapojen. Např. při deficienci dusíku zprostředkovává auxin systémovou i lokální růstovou odpověď podle rozložení nitrátu v půdním profilu. Lokální odpověď je zprostředkována pomocí nitrátového transportéru (NRT1, nitrate transporter 1), který dokáže transportovat i auxin a tím

stimulovat růst postranních kořenů v místě s vyšším obsahem dusíku v půdě (Remans et al. 2006, Krouk et al. 2010). Na systémové úrovni auxin reguluje růst hlavního kořene i postranních kořenů a větvení postranních kořenů podle intenzity deficiencie dusíku, které je rostlina vystavena (Obr. 2.1) (Giehl and von Wirén 2014).



Obr. 2.1 Reakce huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) na dostupnost dusíku. Nadměrná dávka amonného iontu ($++ NH_4^+$) nebo dusičnanu ($++ NO_3^-$) vede k systémové inhibici růstu kořenů, neboť amonný iont inhibuje prodlužování hlavního kořene a nadměrné množství nitrátů potlačuje růst postranních kořenů. Mírný nedostatek dusíku zvyšuje délku hlavního i postranních kořenů, zatímco silná deficiencie dusíku inhibuje růst všech kořenů (Giehl and von Wirén 2014).

Auxin je zapojen i v reakci kořenového systému na nedostatek fosforu, kdy dochází k zastavení růstu hlavního kořene a stimulaci větvení a růstu postranních kořenů (Desnos 2008, López-Bucio et al. 2003, Pérez-Torres et al. 2008). Tato reakce rostlině zřejmě umožňuje přednostně lokalizovat kořenovou biomasu v povrchové vrstvě půdy, která bývá nejbohatší na dostupný fosfát. Rostliny deficientní na fosfor jsou vůči auxinu citlivější, díky zvýšené expresi *TIR1* (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1*), kódujícímu receptor auxinu (Pérez-Torres et al. 2008). U kukuřice (*Zea mays* L.) bylo také dokumentováno, že tvorba postranních kořenů je důležitá pro efektivní získávání fosforu z media (Zhu and Lynch 2004).

Stimulace větvení kořenů byla pozorována také v odpovědi na nedostatek železa, např. u jetele (*Trifolium*), nebo rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) (Jin et al. 2011, Wei Jin et al. 2008). I v tomto případě je zřejmě zapojen auxin, spolu s NO, protože jejich koncentrace v deficientních kořenech rostla. Stimulaci větvení bylo navíc možné potlačit aplikací inhibitorů transportu auxinu (kys. 1-N-naftylftalamové (NPA) i kys. 2,3,5-trijodobenzoové (TIBA) i inaktivací NO (pomocí cPTIO). IAA spolu s NO jsou proto zřejmě primárními signály pro indukci větvení kořenů v podmínkách Fe deficiencie (Jin et al. 2011). Nárůst koncentrace IAA byl pozorován také u kořenů slunečnice (*Helianthus* L.) rostoucích v mediu s nedostatkem Fe (Marschner et al. 1986).

Naopak při deficienci draslíku je růst postranních kořenů spíše inhibován, i když byly popsány rozdíly v odpovědi i mezi jednotlivými ekotypy *Arabidopsis* (Kellermeier et al. 2013). U tabáku (*Nicotiana*) pak bylo popsáno, že inhibice růstu postranních kořenů při nedostatku draslíku souvisí se změnou distribuce auxinu v kořenovém systému. Exprese genů *PIN* (*PIN-FORMED*) byla snížena, což inhibovalo polární transport auxinu. Aplikace NAA na rostliny rostoucí v draslíkovém nedostatku zvýšila tvorbu vedlejších kořenů prvního řádu a jejich délku srovnatelnou s kontrolou (Song et al. 2015).

Auxin je zapojen také v reakci kořenového systému na nadbytek iontů. Například u *Arabidopsis* a rýže (*Oryza sativa* L.) dochází k redistribuci auxinu v kořenovém vrcholu, vedoucí k tvorbě a prodlužování laterálních kořenů, když je vystaven solnému stresu (Wang et al. 2009, Krishnamurthy et al. 2011). Externí aplikace auxinu může také pomoci potlačit negativní účinky toxicity těžkých kovů. Např. u slunečnice bylo pozorováno, že po přidání 100 mM IAA byly zmírněny toxické účinky Pb na růst výhonků a kořenů. IAA potlačila negativní působení kovů na objemový růst, délku kořenů a na celkovou hmotnost sušiny kořene a stonku (Fässler et al. 2010).

Dalším fytohormonem zapojeným v odpovědi kořenového systému na nedostatek živin je ethylen. Ethylen je jediným plynným rostlinným fytohormonem, jeho skupenství mu dává jedinečné vlastnosti v transportu a působení v rostlinných pletivech (Abeles et al. 2012, Yang and Hoffman 1984). Je to nejjednodušší alken lehčí než vzduch a řadí se mezi nejmenší organické molekuly (Cram and Hammond 1969). Nízký obsah endogenního ethylenu podporoval u některých druhů prodlužování kořenů, ale vyšší koncentrace obecně bránila růstu kořenů (Smith and Robertson 1971, Konings and Jackson 1979, Jackson et al. 1985, Abeles et al. 2012).

Existují důkazy o zapojení ethylenu do stresových a adaptivních odpovědí kořene na toxicitu, vodní stres, interakce se symbionty i nedostatek živin (Lynch and Brown 1997). Příkladem může být deficiencie draslíku, kdy byla role ethylenu prokázána analýzou mutantů se změněnou citlivostí k ethylenu. *Arabidopsis ethylene response 1 (etr1)* je mutant s vyřazeným receptorem ethylenu, *ethylene insensitive 2 (ein2)* je mutant necitlivý na ethylen a *constitutive triple response 1 (ctr1)* je mutant s konstitutivní reakcí na ethylen. Klíčové fenotypové změny v těchto mutantech ukázaly, že ethylen je důležitý pro změny délky kořenů při deficienci K^+ (Jung et al. 2009). Ethylen v *Arabidopsis* funguje také jako rychlá signalizační molekula, která vede k indukci ROS (reaktivní formy kyslíku) a nakonec k expresi vysokoafinitního draslíkového transportéru, který je důležitý pro příjem K^+ . Ethylen také hraje roli při prodlužování kořenových vlásků a při úpravě stomatální vodivosti v reakci na sucho a nízký obsah K^+ v okolí (Schachtman 2015).

Také v případě růstové reakce kořenového systému na nedostatek fosforu je zapojen ethylen. Např. u fazolu nedostatek fosforu vedl ke snížení celkové délky kořenů (hlavní a vedlejší kořeny) o více než jednu třetinu. U těchto kořenů byla produkce ethylenu významně vyšší ve srovnání s kořeny rostoucími v mediu s běžnou koncentrací fosforu. Potlačením syntézy ethylenu inhibítorem (aminoethoxyvinylglycinem, AVG) kořeny reagovaly na deficienci méně, po přidání externího ethylenu byl efekt navozen částečně i bez působení deficiencie fosforu. Ethylen může zprostředkovávat jak změny v morfologii kořenů, tak i změny v syntéze proteinů. I přes celkové snížení růstu kořenů, působení ethylenu umožňuje zachovat vysokou hustotu kořenů v podmínkách s nedostatkem fosforu, což může být výhodné pro efektivní průzkum půdy (Borch et al. 1999).

Dalším příkladem je nedostatek železa, kdy bylo pozorováno, že hladiny auxinu a ethylenu, které vyvolávají odpovědi na stres, byly zvýšeny při pěstování rostlin v mediu chudém na Fe (Landsberg 1984, Romera and Alcantara 1994, Schmidt and Bartels 1996). Zvýšená produkce ethylenu v kořenech byla patrná několik dní po přenesení rostlin do podmínek deficientních na Fe, a to především u rostlin se strategií I pro příjem železa, tj. například u okurky (*Cucumis sativus*), rajčete (*Solanum lycopersicum*) nebo hrachu (*Pisum sativum*) (Romera et al. 1999). Indukce reakcí v těchto stresových podmínkách byla také spojena se zvýšením hladiny auxinu v kořenových špičkách (Marschner et al. 1986, Landsberg 1984). ACC (1- aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina; přímý prekurzor syntézy ethylenu) nebo Ethephon (látka uvolňující ethylen) při působení

na kořeny několika rostlinných druhů podporoval růst kořenových vlásků a vznik rhizodermálních transferových buněk podobných těm, které produkují rostliny deficientní na Fe (Schmidt and Bartels 1996, Romera and Alcantara 1994, Schikora and Schmidt 2002). Použití ACC nebo Ethephonu na rostliny okurky (*Cucumis sativus*) s běžným obsahem Fe také významně zvýšilo jejich schopnost redukovat železo v kořenech a zvýšilo kapacitu kořenové Fe³⁺ reduktázy (Romera and Alcantara 1994).

V růstové odpovědi kořenového systému na nedostatek živin jsou zapojeny i další fytohormony, např. cytokininy, kys. abscisová (ABA) nebo strigolaktony. Cytokininy, N⁶ deriváty adeninu, jsou fytohormony, které hrají roli v regulaci celé řady vývojových procesů včetně buněčného dělení, diferenciace buněk, regulace růstu (apikální dominance, R/S poměr), senescence a mnoho dalších. Spolu s auxiny regulují růst kořenového systému, utváření jeho architektury, regulují větvení kořene a diferenciaci vodivých pletiv (Aloni et al. 2006). Cytokininy jsou zapojeny i v reakci rostliny na biotické a abiotické stresové faktory včetně deficiencie živin (Sakakibara 2006, Kieber and Schaller 2014). Nedávné studie např. odhalily molekulární mechanismus biosyntézy a regulace cytokininů závislé na rychlých změnách obsahu dusíku, kdy je exprese některých genů kódujících enzymy biosyntézy cytokininů stimulována přítomností nitrátu (Miyawaki et al. 2004, Takei et al. 2004). Tento mechanismus může být důležitý pro rostliny, které se vyrovnávají s nepředvídatelnou změnou dostupnosti dusíku v prostředí (Sakakibara 2006). Hladina cytokininů v rostlině při nedostatku živin ale spíše klesá, což bylo dokumentováno např. u ječmene (*Hordeum vulgare* L.) nebo kukuřice (*Zea mays* L.) (Korobova et al. 2016, Zhao et al. 2016, Vysotskaya et al. 2016).

Kyselina abscisová (ABA) je univerzální rostlinný stresový hormon, který je produkován v kořenech vystavených různým stresovým faktorům, včetně sucha, salinity a nedostatku živin. Právě nedostatek živin stimuluje biosyntézu ABA v kořenech a zesiluje její signál (Peuke et al. 1994). ABA slouží jako signál na dlouhou vzdálenost, který upravuje vodní poměry ve stonku (při suchu zavírání průduchů a transport vody ze starších částí do meristémů) a v kořenech (za sucha zvyšuje hydraulickou vodivost, zastavuje vývoj vedlejších kořenů a podporuje růst hlavního kořene, čímž zvyšuje toleranci k suchu (Hose et al. 2001, Wan et al. 2004). Spíše než na architekturu kořenového systému, má ale ABA větší vliv na anatomickou stavbu kořene a jeho hydraulickou vodivost, proto bude její role podrobněji popsána dále v textu (viz kapitola: Vliv deficiencie živin na plasticitu vývoje apoplastických bariér, role fytohormonů).

Nedávno bylo prokázáno, že na architekturu kořenového systému působí také strigolaktony (Koltai 2011, Foo et al. 2013). Tyto terpenoidní laktony jsou odvozené od karotenu, a byly dlouho známé jako signální molekuly pro rostlinné symbionty (Matusova et al. 2005). Existují práce, které dokumentují zvýšenou produkci strigolaktonů v kořenech při nedostatku fosforu, ale i dusíku. Strigolaktony jsou následně exudovány do rhizosféry, což vede ke stimulaci rozvoje arbuskulární mykorhizy (Yoneyama et al. 2007). Strigolaktony jsou ale zřejmě zapojeny i v regulaci prodlužování kořenových vlásků pomocí modulace auxinového toku (Koltai 2011). Jakožto modulátory auxinového toku mohou strigolaktony ovlivňovat i růst laterálních kořenů. Při redukovaném importu auxinu do kořene dochází k inhibici tvorby laterálních kořenů, zatímco zvýšený tok auxinu indukuje tvorbu laterálních kořenů (Ruyter-Spira et al. 2011, Sun et al. 2014).

2.3.2 Vliv deficiencie živin na plasticitu vývoje apoplastických bariér, role fytohormonů

Z hlediska diplomové práce je nejdůležitější otázkou, zda a do jaké míry je diference bariér ovlivněna dostupností živin. Existuje řada prací, které dokumentují, že apoplastické bariéry vykazují výraznou plasticitu vývoje v odpovědi na různé environmentální faktory. Z hlediska plasticity diference se jeví významnější vrstva exodermální, která na podmínky prostředí reaguje variabilněji (Hose et al. 2001). Avšak podrobnější výzkum na endodermis ukázal, že i tato bariéra může být plastická ve svém vývoji (Colmer et al. 1998, Karahara et al. 2004, Lux et al. 2010). Rozsah a četnost, ve kterých se apoplastické bariéry diferencují, jsou závislé na vnějších podmínkách, na druhu rostliny vyskytující se v různých prostředích (Enstone et al. 2003) a dokonce se liší i mezi jednotlivými genotypy (Colmer et al. 1998). K urychlení diference apoplastických bariér dochází nejčastěji za přítomnosti stresových faktorů (Karahara et al. 2004, Armstrong and Armstrong 2005, Soukup et al. 2007, Lux et al. 2010). Významným stresovým faktorem, který ovlivňuje postup diference endodermis i exodermis, je např. dostupnost kyslíku. Rostliny v neprovzdušňované hydroponii měly v endodermis redukovanou tvorbu SL. Naopak v exodermis se silně zrychlilo uložení SL i CP. Tímto způsobem je zřejmě redukováno uvolňování kyslíku z aerenchymatických kanálů do rhizosféry a je zvýšena difúze kyslíku do středního válce, což v důsledku umožňuje lepší zásobení všech částí kořene kyslíkem (Enstone and Peterson 2005). Naopak v podmínkách s dobrou dostupností kyslíku např. aeroponie, je diference CP a ukládání SL rychlejší

v endodermis než v exodermis (Enstone and Peterson 2005, Zimmermann et al. 2000, Soukup et al. 2007, Schreiber et al. 2007).

Silnými exogenními stresory jsou také sucho a salinita (Enstone et al. 2003). Salinita zvýšila ukládání hydrofobního alifatického suberinu v kořenech, což zvýšilo nepropustnost bariér (Krishnamurthy and Vissing-Jorgensen 2011, Krishnamurthy et al. 2009). Silně působí také teplota (Armstrong et al. 2000) acidita, patogeny (Enstone et al. 2003), nebo fytotoxiny (Armstrong and Armstrong 2001, Armstrong et al. 2000). Pro těžké kovy bylo opakovaně ukázáno, že jejich přítomnost v rhizosféře diferenciaci bariér urychluje (Lux et al. 2010). U endodermis kukuřice (*Zea mays* L.) způsobily těžké kovy ztloustnutí vnitřních tangenciálních buněčných stěn (Degenhardt and Gimmler 2000). Lze tedy shrnout, že stresové faktory jako hypoxie, sucho, zasolení či toxicita vedou k rychlejší diferenciaci apoplastických bariér, což posiluje ochrannou funkci těchto vrstev.

Deficience živin je dalším významným stresovým faktorem, který na rostliny působí. Zda a jakým způsobem deficience živin ovlivňuje rychlost a rozsah diferenciaci apoplastických bariér je však podstatně méně prozkoumáno. Doposud provedené studie mají navíc v některých případech protichůdné výsledky. Intenzivnější lignifikace endodermálních CP a snížená hydraulická vodivost kořenů byla popsána při deficienci NO_3^- u kukuřice (*Zea mays* L.), ale deficience K^+ vyvolala ve stejném experimentu opačný efekt. (Pozuelo et al. 1984) popisují stimulaci suberinizace endodermis i exodermis u kukuřice při nedostatku Mg^{2+} . Naopak u skočce (*Ricinus communis* L.) byla při deficienci N popsána snížená míra suberinizace endodermis i exodermis, což autoři vysvětlují jako mechanismus pro usnadnění vedení živin apoplastem (Schreiber et al. 2007). V další práci došlo při nadbytku živin u kořenů ostřice (*Carex gracilis*) ke zpoždění tvorby bariér, což zřejmě způsobil rychlejší růst kořenů a následná diferenciaci pletiv dále za špičkou kořene. Naopak kořeny pěstované v oligotrofní vodě měly exodermis silněji vyvinutou (Čížková-Končalová and Bauer 1993).

Z těchto prací vyplývá, že v různých podmínkách, jako je nedostatek určitého prvku v mediu, reagují exodermis i endodermis změnami v rychlosti diferenciaci. Rozsah diferenciaci bariér následně ovlivňuje transportní vlastnosti kořene. Významná je v tomto směru práce Barberon a spoluautorů (2016) zaměřená na endodermální vrstvu u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*). Histochemické barvení suberinových lamel (SL) za pomoci Fluorol yellow 088 odhalilo, že je suberinizace u rostlin *Arabidopsis* klíčících

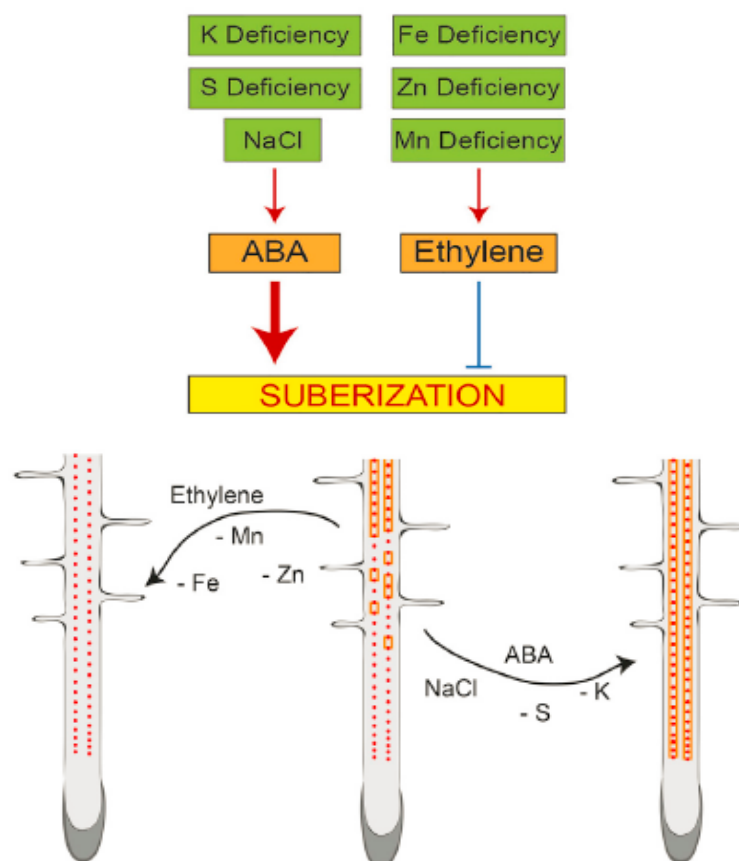
v podmínkách deficientních na Fe, Mn a Zn zpožděna, zatímco při klíčení v podmínkách s deficiencí K a S je zvýšena (Obr. 2.2). Tyto změny jsou specifické pro SL, protože tvorba funkční sítě CP zůstala neovlivněna, což bylo prokázáno použitím propidium iodidu jako apoplastického traceru (látky, která difunduje z rhizosféry apoplastem do nitra kořene). Z toho je patrné, že mohou různé výživové nedostatky ovlivňovat vývoj SL pozitivně i negativně s dopadem na minerální výživu. Deficience K v mediu nebo inhibice příjmu K^+ způsobená mutací v K^+ transportéru zvyšují depozici suberinu, z čehož plyne, že zvýšená suberinizace je adaptivní odpovědí na nedostatek K a pomáhá rostlinám při udržování draselné homeostázy v deficientních podmínkách. Dále bylo zjištěno, že mutantní rostliny *Arabidopsis* deficientní v syntéze suberinu vykazují silný nárůst akumulace Na, a že salinita vede ke zvýšení ukládání suberinu. Naopak při deficienci Fe v mediu nebo u *irt1* (iron regulated-transporter 1) mutantních rostlin deficientních na Fe díky nefunkčnosti transportéru Fe bylo pozorováno snížené množství suberinu. To dokazuje, že nejen zvyšování, ale i snížení suberinizace jsou fyziologicky adaptivní reakce (Barberon et al. 2016).

Ukládání suberinu tedy reaguje na širokou škálu stresů ve výživě. Pro endodermální vrstvu pak bylo recentně ukázáno, že tato reakce je zprostředkována stresovými hormony ABA a ethylenem (Barberon et al. 2016). V reakci na ethylen se zjistila nápadná schopnost kořene regulovat nejen syntézu suberinu, ale také ho dokonce selektivně degradovat, čímž se mění radiální tok vody. Rostliny *Arabidopsis*, na které působil přímý prekurzor syntézy ethylenu ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina), vykazovaly 40% snížení celkového obsahu suberinu ve srovnání s neošetřenými rostlinami. Účinek byl specifický jen pro SL, protože detekovatelnost CP v endodermis rostlin ošetřených ACC se nezměnila (Barberon et al. 2016).

ABA naopak vyvolává zvýšení ukládání suberinu, které pozorujeme při nedostatku některých živin (Obr. 2.2). ABA má významný účinek při indukci genů asociovaných se suberinem (Cottle and Kolattukudy 1982, Kosma et al. 2014, Yadav et al. 2014). Přímé chemické měření obsahu suberinu po aplikaci ABA ukázalo silné zvýšení obsahu suberinu v kořenech, 43% nárůst celkového obsahu monomerů suberinu ve srovnání s kontrolními rostlinami (Barberon et al. 2016). Aplikace ABA může dokonce částečně obnovit suberinizaci i v *ctr1* (Constitutive triple response 1) mutantu *Arabidopsis*, u kterého je konstitutivně aktivní ethylenová signální dráha v důsledku mutace

v negativním regulátoru ethylenové odpovědi. Tato pozorování podporují antagonismus signálních cest ethylenu a ABA v regulaci suberinizace (Barberon et al. 2016).

ABA také silně ovlivňuje radiální tok vody kořenem (Hartung et al. 2005). Tyto toky byly zkoumány u kořenů kukuřice (*Zea mays* L.) v podmínkách nedostatku různých živin. Podstatné zvýšení koncentrace ABA v kořenech bylo pozorováno u kořenů s nedostatkem draslíku a dusíku, ne však fosforu, síry a vápníku (Schraut et al. 2005). V rámci kořenů může ABA zvýšit hydraulickou vodivost kortikálních kořenových buněk, což má za následek zlepšenou absorpci vody v podmínkách mírného nedostatku vody (Hose et al. 2001, Wan et al. 2004). Mechanismus, kterým ABA ovlivňuje celkovou hydraulickou vodivost kořenů, není znám, ale pravděpodobně působí na úrovni plazmatické membrány (Hose et al. 2000). ABA může stabilizovat aquaporiny, nebo zvyšovat jejich hustotu v cytoplazmatických membránách a může odvrátit jejich kolaps při průchodu vody skrz póry (Wan et al. 2004, Steudle and Peterson 1998).



Obr. 2.2 Působení fytohormonů na diferenciaci endodermis v podmínkách nedostatku živin. Deficience draslíku, síry a přítomnost NaCl v mediu stimuluje tvorbu ABA, která následně stimuluje suberinizaci. Deficience zinku, železa a manganu stimuluje produkci ethyleny, který naopak suberinizaci inhibuje (Barberon et al. 2016).

Výsledky týkající se fyziologických vztahů mezi živinami, biosyntézou ABA a akumulací v kořenech, průtokem vody kořeny a intenzitou signálu ABA v xylému jsou nicméně do jisté míry nejednoznačné. (Schraut et al. 2005, Freundl et al. 1998) prokázali, že významné množství ABA je transportováno s proudem vody přímo přes endodermální CP do kořenů u kukuřice (*Zea mays* L.). Intenzita signálu ABA v xylému je dána biosyntézou a radiálním transportem ze středního válce, neboť ABA jde s proudem vody přes CP do xylému (Freundl et al. 2000, Freundl et al. 1998). V kořenech kukuřice pěstované při nedostatku NO_3^- byla tvorba CP zesílena, zatímco při nedostatku draslíku se CP nediferencovaly. V těchto kořenech byl podstatně zvýšen radiální tok vody a spolu s ním zde byla i silná akumulace ABA ve středním válci a v endodermis. Naopak průtok vody kořeny deficientními na P nebyl výrazně ovlivněn a kořeny nevykazovaly zvýšený obsah ABA (Schraut et al. 2005). Zvýšená akumulace ABA v kořenech deficientních na N může být výsledkem sníženého průtoku ABA přes endodermis (Peuke et al. 1994). V endodermis, kde CP ještě nejsou diferencované, jako je tomu u špiček kořene, nebo kde prorůstají postranní kořeny, může být ABA transportována apoplastem do pericyklu (Freundl et al. 1998).

3 Metodika

3.1 Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (hydroponická kultivace)

3.1.1 Experiment 1. 1

3.1.1.1 Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál byla použita kukuřice setá (*Zea mays* L.) kultivar Cefran.

3.1.1.2 Kultivace rostlin

Obilky byly nejprve vloženy na 20 minut do teplé vody (cca 30°C) a následně pak, pro vyklíčení, rozloženy na mokry papír v Petriho misce, která byla zakryta dalším mokrym papírem a opět Petriho miskou. Obě misky byly umístěny vertikálně (pro lepší a přímější růst kořenů) na 72 hodin do termostatu nastaveného na 25°C.

Po vyklíčení byly reprezentativní rostliny (tj. s dobře narostlými cca 3 cm dlouhými kořeny) přeneseny do plastových nádob o objemu 12l. Rostliny byly v nádobách umístěny po 10 a hladina byla pokryta polyuretanovými kousky, aby nedocházelo k růstu řas a vystavení kořenů světlu (Obr. 3.1). Do všech nádob bylo zavedeno vzduchování. V kultivační místnosti byly nastaveny konstantní podmínky: 16/8 h denní/noční fotoperioda (ozáření 435 W.m⁻²), 22/18 °C denní/noční termoperioda, relativní vlhkost vzduchu 50 - 75%. Rostliny byly v plastových nádobách pěstovány po dobu 14 dní. Kultivační roztoky byly v polovině trvání experimentu vyměněny. Ke kultivaci byl pro kontrolní variantu použit Hoaglandův roztok (Hoagland and Arnon 1950) zředěný na 1/4 s přidavkem mikroprvků (Laštůvka and Minář 1967) o následujícím složení (μM): NO₃⁻ 3750; PO₄³⁻ 250; Ca²⁺ 1249; K⁺ 1501; Mg²⁺ 250; SO₄²⁻ 250; BO₃³⁻ 11,6; Fe²⁺ 10,2; Mn²⁺ 2,3; Zn²⁺ 0,34; Cu²⁺ 0,12; Mo₇O₂₄²⁻ 0,015. Dále bylo definováno šest deficientních variant, v každé z nich byl jeden prvek vynechán (viz tabulka 3.1). Při koncipování jednotlivých variant byla snaha v co největší míře dodržet shodné koncentrace všech ostatních prvků s výjimkou studovaného prvku. Byly proto provedeny následující úpravy:

1. Ve variantě bez N bylo třeba dorovnat obsah Ca a K, které nebyly dodány v podobě nitrátů. 51,0 mg/l Ca obsažených v Ca(NO₃)₂ · 4H₂O bylo proto dodáno v podobě CaCl₂ · H₂O a 48,8 mg/l K obsažených v KNO₃ bylo dodáno v podobě K₂SO₄

2. Ve variantě bez Ca bylo třeba dorovnat obsah N nedodaný v podobě dusičnanu vápenatého. 35,0 mg/l N obsažených v $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bylo dodáno v podobě KNO_3
3. Ve variantě bez Mg bylo dodáno 7,99 mg/l S obsažené v $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve formě K_2SO_4
4. Ve variantě bez K bylo nutno dodat 17,5 mg/l N obsaženého v KNO_3 ve formě $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 7,7 mg/l P obsaženého v KH_2PO_4 ve formě $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Celkové dávkování živin do kultivačního roztoku v jednotlivých variantách je uvedeno v tabulce 3.1.

Makroprvky	kontrola	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-Fe
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	295,5	0	295,5	442,7	0	295,5	295,5
KNO_3	126,5	0	126,5	0	379	126,5	126,5
KH_2PO_4	34	34	0	0	34	34	34
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	61,4	61,4	61,4	61,4	61,4	0	61,4
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	162,1	0	0	0	0	0
K_2SO_4	0	108,8	21,8	0	0	43,4	0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0	0	0	38,7	0	0	0
Mikroprvky	kontrola	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-Fe
Fe citrát	5	5	5	5	5	5	0
H_3BO_4	0,715	0,715	0,715	0,715	0,715	0,715	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453	0,453
ZnSO_4	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056
$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019
CuSO_4	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020

Tab. 3.1 Složení kultivačních roztoků pro jednotlivé deficiencie (mg/l)



Obr. 3.1 Hydroponická kultivace rostlin kukuřice (*Zea mays* L.).

3.1.1.3 Vyhodnocení vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté

3.1.1.3.1 Morfologická analýza kořenů

Analýza byla prováděna na primárních (seminálních) kořenech kukuřice (*Zea mays* L.). Z každé varianty byly pro účel analýzy odebrány primární kořeny všech 10 rostlin. Kořeny staré 18 dní byly naskenovány a byla změřena délka jejich hlavního kořene a délka nevětvené části hlavní osy pomocí programu NIS elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging; <http://www.nis-elements.cz/en>). Hlavní kořeny byly následně fixovány ve 4 % formaldehydu.

3.1.1.3.2 Anatomická analýza kořenů

Z fixovaných kořenů byly pro účel anatomické analýzy odebrány vždy tři od každé varianty. Anatomická analýza byla provedena v několika různých pozicích na hlavní ose primárního kořene. U vybraných kořenů byly vždy odebrány úseky o délce 1cm ze $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{6}$ délky kořene od špičky a z oblasti prorůstání prvních postranních kořenů. Jednotlivé úseky byly nařezány na ručním mikrotomu. Pro detekci suberinu byly řezy barveny barvou Sudan Red 7B (0,01 %) (Brundrett et al. 1991) po dobu 1 hodiny, pro detekci ligninu berberin hemisulfátem (0,1 % aq.) také 1 hodinu (Brundrett et al. 1988) a poté

ještě 10 minut dobarveny genciánovou violetí (0,05 % aq.). Vzorky byly uzavřeny do 65 % glycerolu a pozorovány mikroskopem Olympus BX51 vybaveným filtrem UV Olympus U-MWU a digitální kamerou Apogee U4000. U pozorování řezů jsem se zaměřil na vývoj exodermální a endodermální vrstvy v kořenech, tedy konkrétně na výskyt buněk s přítomnými Casparyho proužky (CP) nebo suberinovými lamelami (SL). Stupeň diference byl hodnocen přiřazením kategorie 0-5 podle toho, v kolika buňkách endodermální či exodermální vrstvy byly uloženy CP (Tab. 3.2) Stejně kategorie byly zavedeny i pro výskyt SL v endodermální i exodermální vrstvě.

Kategorie	
0	v žádných buňkách nebyly CP detekovány
I	< 20% buněk s vyvinutými CP
II	50% buněk s vyvinutými CP
III	> 90% buněk s vyvinutými CP
IV	celá buněčná vrstva obsahovala vyvinuté CP

Tab. 3.2 Kategorie použité pro hodnocení výskytu Casparyho proužků (CP) v exodermis analyzovaných kořenů. Stejným způsobem byla hodnocena také četnost suberinových lamel (SL) v endodermis i exodermis.

3.1.2 Experiment 1. 2

Druhý experiment proběhl stejně jako první, jen pro anatomickou analýzu bylo z každé varianty odebráno pět kořenů namísto tří. A pro anatomickou analýzu byla vynechána nevyhovující pozice (viz dále) prorůstání prvních postranních kořenu. Analyzované pozice pro tento experiment tedy byly: $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{6}$ délky kořene od špičky.

3.2 Analýza vlivu lokálního nedostatku živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (kultivace „sendvičovou“ metodou)

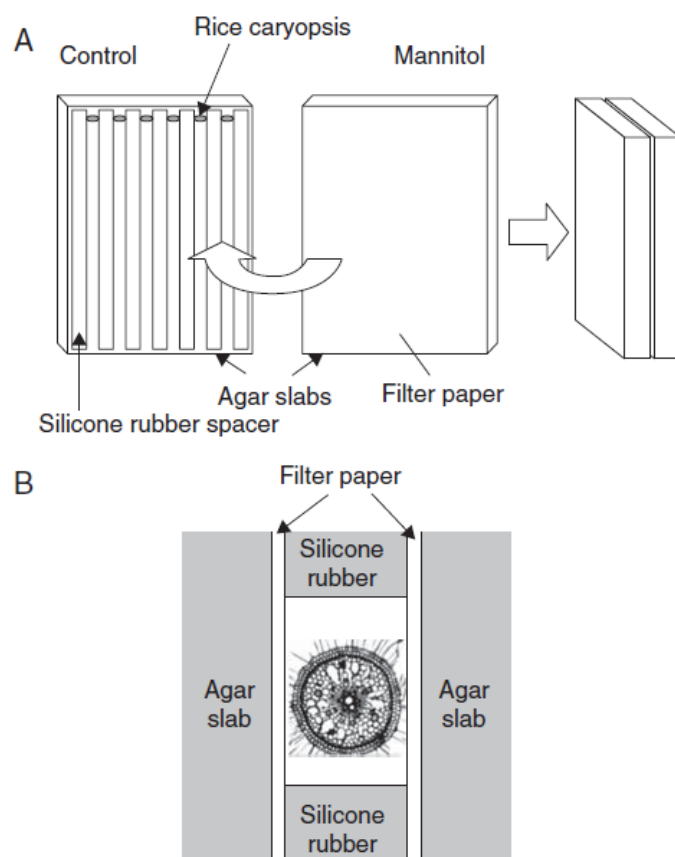
3.2.1 Experimenty 2.1. – 2.3.

3.2.1.1 Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál byla použita kukuřice setá (*Zea mays* L.)

3.2.1.2 Kultivace rostlin

Semena kukuřice seté (*Zea mays* L.) byla naklíčena stejným způsobem jako pro pěstování v hydroponii (viz. Experiment 1.1) a poté byla přenesena mezi dvě velké tenké agarové plotny (cca 20x20x0,5cm), které byly nalepeny na skleněných tabulích (20x25cm). Tyto dvě plotny obsahovaly stejnou koncentraci agaru (2%), ale každá měla různý obsah dusíku. Metoda kultivace byla upravena podle, viz Obr. 3.2 (Karahara et al. 2012).



Obr. 3.2 Schéma „Agarového sendviče“ (Karahara et al. 2012).

První kontrolní plotna obsahovala živiny z Hoaglandova roztoku (Hoagland and Arnon 1950) zředěný na 1/4 s přidavkem mikroprvků (Laštůvka and Minář 1967) o následujícím složení (μM): NO_3^- 3750; PO_4^{3-} 250; Ca^{2+} 1249; K^+ 1501; Mg^{2+} 250; SO_4^{2-} 250; BO_3^{3-} 11,6; Fe^{2+} 10,2; Mn^{2+} 2,3; Zn^{2+} 0,34; Cu^{2+} 0,12; $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{2-}$ 0,015, tedy ve stejném složení jako kontrolní kultivační roztok v experimentu 1.1. Druhá plotna byla deficientní na dusík (obsah viz tabulka 3.1).

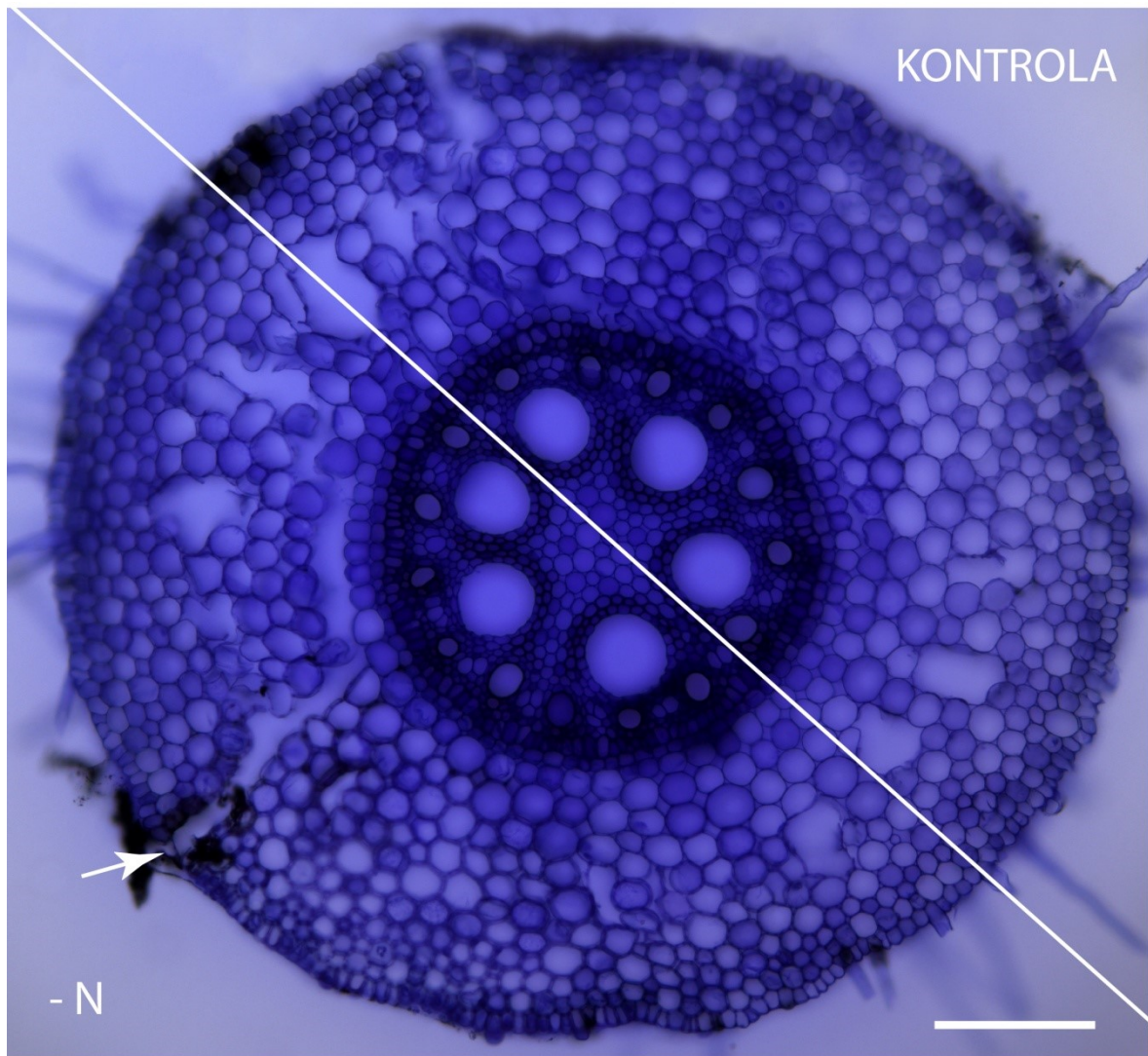
Agarové plotny, mezi kterými se nechaly prorůst kořeny, byly k sobě pevně přitisknuty za pomoci kancelářských svorek na papír a izolepy. Jednotlivé rostliny byly od sebe odděleny silikonovými proužky, aby se zamezilo křížení kořenů při růstu a také, aby se co

možná nejvíce zmenšila plocha doteku agarových ploten a nedocházelo tak k difúzi živin mezi medii o různém složení. Agarové bloky byly orámovány navlhčenými molitanovými pásky, pro delší udržení vlhkosti agaru. Celý tento „sendvič“ byl umístěn na výšku do 12l nádoby, která byla zakryta mirelonem s přesně vyříznutým otvorem pro styk horní části „sendviče“ se světlem (Obr. 3.3). V nádobě byla na dně vrstva vody s plovákem, aby agar v „sendviči“ zbytečně nevysychal, ale zároveň aby nebyl v kontaktu s vodou. Agarový sendvič byl shora denně zvlhčován, aby nedocházelo k vysychání agaru a oddalování agarových ploten od rostoucích kořenů. Kultivace probíhala tři dny, v kultivační místnosti byly nastaveny konstantní podmínky: 16/8 h denní/noční fotoperioda (ozáření 435 W.m⁻²), 22/18 °C denní/noční termoperioda, relativní vlhkost vzduchu 50 - 75%. Pěstováno bylo více variant s různou koncentrací dusíku v agarových plotnách. Byla kultivována i varianta rostlin zbavených obilek, aby se zamezilo efektu čerpání zásob ze semen. Ke každému experimentu byla pěstována kontrola se stejným obsahem látek v obou agarových plotnách.

Nejprve bylo nutné několikrát kultivaci zopakovat, aby bylo dosaženo optimalizace kultivačního postupu. Až po řádně ozkoušených kultivacích proběhly experimenty pro anatomickou analýzu. Poloviny kořenů rostoucí ve styku s deficientním agarem (-N) byly podélně naříznuty a obarveny černou voděodolnou tuší, aby bylo možno na řezech jednoznačně určit, která strana kořene byla v kontaktu s N deficientní agarovou vrstvou (Obr. 3.4).



Obr. 3.3 Foto kultivace „Agarového sendviče“. Vlevo je obrázek z kultivační místnosti, vpravo je sendvič s označenými délkami přirostlých kořenů



Obr. 3.4 Řez kořenem rostoucím v agarovém sendviči. Bílá čára rozděljuje řez na dvě poloviny. Jedna polovina rostla ve styku s mediem deficientním na dusík. Tato polovina byla označena řezem a černou tuší (bílá šipka). Druhá polovina rostla na kontrolním mediu. (měřítko 100um)

3.2.1.3 Vyhodnocení lokálního nedostatku živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté

3.2.1.3.1 Morfologická analýza

Morfologická analýza proběhla u všech experimentů (2.1 - 2.3) stejně. Z fotografií agarových „sendvičů“ byl, v programu NIS elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging; <http://www.nis-elements.cz/en>), změřen přírůstek kořenů v agaru, celková délka kořenů a délka nadzemních částí.

3.2.1.3.2 Anatomická analýza kořenů

Ze sedmi rostlin rostoucích v agarovém „sendviči“ byly vybrány tři reprezentativní, jejichž hlavní kořeny rostly po celou dobu kultivace rovně mezi agary. Kořeny na straně, která byla při růstu ve styku s plotnou deficientní na dusík, byly označeny tuší a mělkým podélným řezem žiletkou. Odebrány byly pouze ty části hlavních kořenů, které přirostly v „sendviči“. Kořeny byly fixovány ve 4 % formaldehydu.

Na radiálních řezech byl pozorován rozdíl ve vývoji exodermální a endodermální vrstvy mezi dvěma polovinami kořene, které byly v kontaktu s agarovou vrstvou o různém obsahu živin. Histochemické barvení bylo provedeno stejně jako v experimentu 1.1.

3.2.1.4 Experiment 2. 1

Tento experiment měl za úkol ověřit, zda lokální nedostatek dusíku ovlivní anatomický vývoj exodermis v kořeni. Za tímto účelem byla nasazena pouze jedna varianta sendviče. Agarová vrstva s obsahem prvků odpovídajícím kontrolní variantě a N deficientní variantě (dále značeno K/N).

Anatomická analýza byla provedena u třech hlavních kořenů, ze kterých byly odebrány segmenty o délce 0,5 cm začínající 3 cm za kořenovou špičkou. Každý kořen byl takto po centimetru prořezán na ručním mikrotomu až na pozici 15 cm za špičkou, aby byla nalezena pozice, ve které jsou exodermální CP již diferencovány.

3.2.1.5 Experiment 2. 2

V tomto experimentu byly pěstovány rostliny ve dvou variantách: s oběma agarovými vrstvami o stejném kontrolním složení (dále značeno K/K) a s jednou agarovou plotnou bez dusíku a druhou kontrolní (K/N). Každá varianta kultivace byla 2x nezávisle opakována. Z každé varianty byly vybrány tři kořeny, které byly řezány v pozicích 2, 4 a 6 cm za špičkou. Experiment byl vyhodnocen stejně jak předešlý experiment a navíc byla u jednotlivých kořenových pozic podrobně vyhodnocena také frekvence výskytu apoplastických bariér v exodermis i endodermis pomocí kategorií použitých pro hodnocení experimentu 1.1.

3.2.1.6 Experiment 2. 3

V tomto experimentu bylo opět hodnoceno možné lokální působení deficientního dusíku na tvorbu apoplastických bariér. Dále byla pozorována vzdálenost začátku diferenciac

exodermis od kořenové špičky a také jak se liší mezi variantou K/N a variantou K/K. Pro porovnání efektu čerpání zásob ze semen byly v tomto experimentu pěstovány i rostliny zbavené obilek. V této kultivaci byly tedy nasazeny 4 různé varianty agarových sendvičů:

1. K/N s obilkou
2. K/K s obilkou
3. K/N bez obilky
4. K/K bez obilky

Z hlavních kořenů byly odebrány segmenty o délce 0,5 cm začínající 1 cm od báze kořene. Kořeny byly takto (směrem ke špičce) po centimetru prořezány na ručním mikrotomu až na pozici 2 cm za špičkou.

3.3 Analýza vlivu fytohormonů na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté

3.3.1 Experiment 3.

3.3.1.1 Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál byla použita kukuřice setá (*Zea mays* L.) Semena kukuřice byla naklíčena stejným způsobem jako v předchozích experimentech (viz. Experiment 1.1), poté byla přenesena do 12 l nádob s přidaným Hoaglandovým roztokem (Hoagland and Arnon 1950) zředěným na 1/4 s přídavkem mikroprvků (Laštůvka and Minář 1967) o následujícím složení (μM): NO_3^- 3750; PO_4^{3-} 254; Ca^{2+} 1249; K^+ 1501; Mg^{2+} 510; SO_4^{2-} 510; BO_3^{3-} 11,6; Fe^{2+} 5,1; Mn^{2+} 2,3; Zn^{2+} 0,34; Cu^{2+} 0,12; $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{2-}$ 0,015. Po dvou dnech byly ze tří rostlin odebrány hlavní kořeny jako kontrola před aplikací fytohormonů. Další rostliny byly přesunuty do čtyř nádob o objemu 5500 ml, také s Hoaglandovým roztokem, přidanými mikroprvky a zavedeným vzduchováním (Obr. 3.5). V této části kultivace byly definovány čtyři varianty kultivace (viz tab. 3.3).

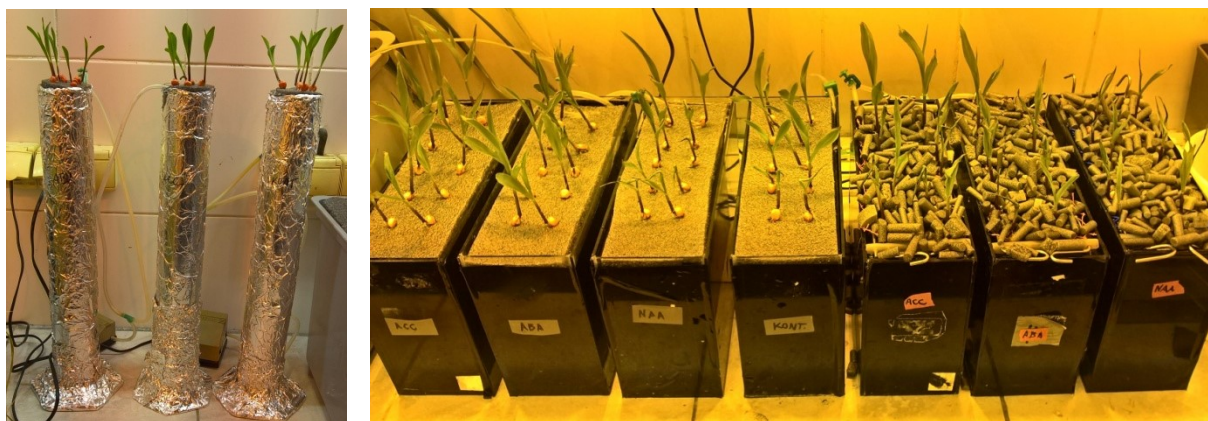
Varianta	Koncentrace v kultivačním roztoku
ABA	1uM ABA
ACC	1uM ACC
NAA	1uM NAA
kontrola	bez přídavku fytohormonů

Tab. 3.3 Jednotlivé varianty kultivace pro přípravu fytohormonů.

Jednotlivé fytohormony byly do kultivačního roztoku dávkovány z připravených zásobních roztoků. ABA a NAA byly rozpuštěny v malém množství etOH a doředěny vodou, ACC bylo rozpuštěno ve vodě.

Kultivaci bylo nutné nejprve optimalizovat, protože při první kultivaci roztoky v nádobách s fytohormony rozpuštěnými v etanolu dostaly po dvou dnech mléčný zákal a na kořenech byl silný bílý povlak. Proto bylo v další kultivaci výrazně sníženo množství etanolu k rozpouštění ABA a NAA. Po této úpravě už k nežádoucímu zakalení roztoku nedošlo a toto uspořádání bylo použito pro hodnocení.

3.3.1.2 Vyhodnocení vlivu fytohormonů na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté



Obr. 3.5 Foto kultivací s fytohormony. Varianta s černými akvárii (vpravo) byla použita pro hodnocení.

3.3.1.2.1 Morfologická analýza kořenů

Z pěstovaných rostlin byly odebrány pouze tři hlavní kořeny z každé varianty, které byly naskenovány a následně fixovány v 4 % formaldehydu.

3.3.1.2.2 Anatomická analýza kořenů

U vybraných kořenů byly vždy odebrány úseky o délce 1 cm ze $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{6}$ délky kořene od špičky. Dále probíhal stejný postup analýzy jako v Experimentu 1. 1.

3.4 Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté s dodáním živiny na list

3.4.1 Experiment 4.

3.4.1.1 Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál byla použita kukuřice setá (*Zea mays* L.)

3.4.1.2 Kultivace rostlin

Semena byla naklíčena a vysazena stejně jako v Experimentu 1.1. Rostliny byly do 12l nádob umístěny po 6 a hladina byla pokryta polyuretanovými kousky, aby nedocházelo k růstu řas a vystavení kořenů světlu. Do všech nádob bylo zavedeno vzduchování. V kultivační místnosti byly nastaveny konstantní podmínky: 16/8 h denní/noční fotoperioda (ozáření $435 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$), 22/18 °C denní/noční termoperioda, relativní vlhkost vzduchu 50 - 75%. Ke kultivaci byl použit Hoaglandův roztok (Hoagland and Arnon 1950) (viz tab. 3.1.). Deficientní roztoky byly do sedmi nádob rozděleny tak, že vznikly varianty vždy po dvou nádobách: 1. deficientní na N, 2. deficientní na K a 3. deficientní na Fe. V poslední nádobě byla opět pěstována kontrola. V těchto nádobách byly rostliny pěstovány po dobu 14 dní. Kultivační roztoky byly v polovině trvání experimentu vyměněny.

Na listy rostlin se po dvou dnech pěstování v nádobách začaly za pomoci rozprašovačů aplikovat roztoky. Na rostliny pěstované v nádobě s chybějícím N se deficientní prvek dodával na list ve formě 20mM KNO_3 (Peuke and Jeschke 1998), deficientní K byl dodán jako 5mM KCL a deficientní Fe bylo nahrazeno 2mM FeSO_4 . Tyto roztoky obsahovaly demineralizovanou vodu s přidaným detergentem 0,01% SILWET. Aplikace postřiků byla prováděna vždy jen na jednu nádobu z výše zmíněných variant, kontrola a každá druhá nádoba byly ošetřeny pouze roztokem z demineralizované vody a 0,01% SILWETu (tab. 3.4).

Varianta	Deficientní prvek v kultivačním roztoku	Náhrada prvku na list
1. -N s aplikací N na list	N	20mM KNO ₃ , destil. H ₂ O + SILWET
2. -N	N	destil. H ₂ O + SILWET
3. -K s aplikací K na list	K	5mM KCL, destil. H ₂ O + SILWET
4. -K	K	destil. H ₂ O + SILWET
5. -Fe s aplikací Fe na list	Fe	2mM FeSO ₄ , destil. H ₂ O + SILWET
6. -Fe	Fe	destil. H ₂ O + SILWET
7. Kontrola	žádný	destil. H ₂ O + SILWET

Tab. 3.4 Varianty postřiků na listy kultivovaných rostlin.

3.4.1.3 Vyhodnocení vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté s dodáním živiny na list

3.4.1.3.1 Morfologická analýza

Z kultivace byly odebrány všechny hlavní kořeny a celé nadzemní části rostlin. Kořeny byly změřeny a fixovány ve 4 % formaldehydu s fosfátovým pufrem. Nadzemní části rostlin byly změřeny a zváženy, poté byly usušeny v termostatu na 80°C a opět zváženy.

3.5 Statistické zpracování dat

Statistické zpracování dat bylo u všech experimentů provedeno v programu NCSS 9 verze 9.0.15 (Hintze, J. 2013 NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; www.ncss.com). Pro výpočet korelace byl použit Correlation matrix.

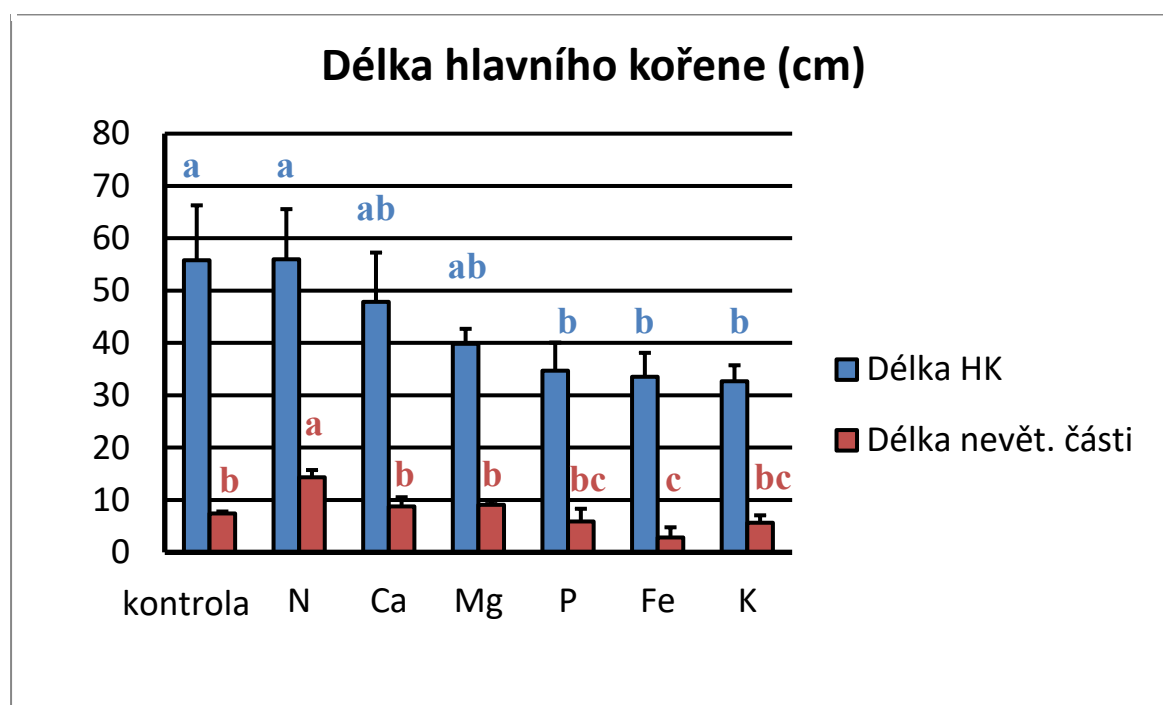
4 Výsledky

4.1 Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (kultivace v hydroponii)

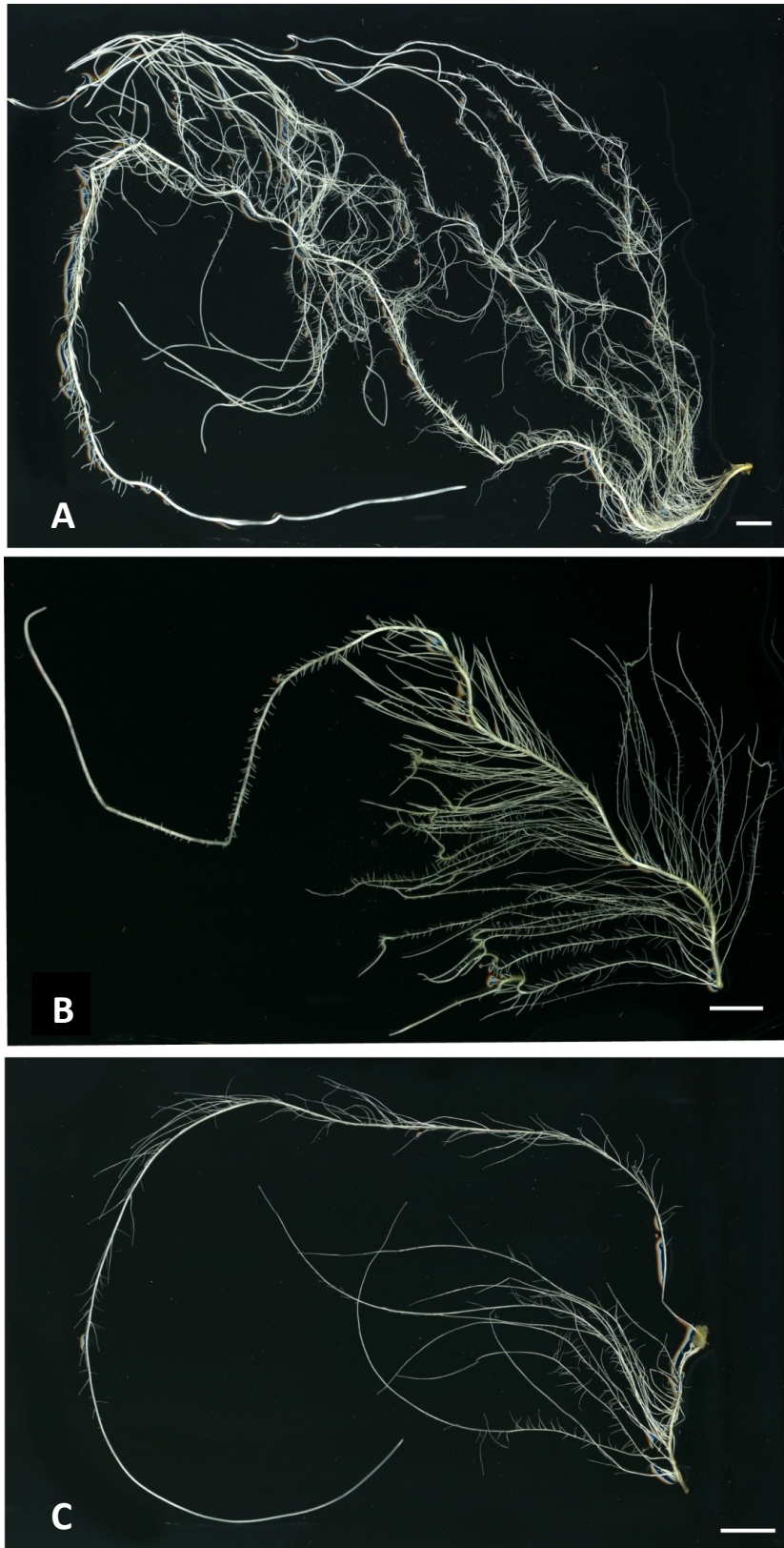
4.1.1 Experiment 1.1

4.1.1.1 Morfologická analýza kořenů

V rámci tohoto experimentu byly rostliny po vyklíčení pěstovány 14 dní v kultivačním roztoku, ve kterém byla vždy jedna živina vynechána. Rostliny kukuřice rostoucí v jednotlivých deficiencích vykazovaly různou délku hlavních kořenů (Graf 1.; ANOVA, $p < 0,05$). Výrazně kratší hlavní kořeny byly pozorovány u rostlin v deficienci P, Fe a K v porovnání s kontrolní variantou a N deficientní variantou (Graf 1). Významně se u těchto kořenů také lišily délky nevětvených částí (Graf 1.; ANOVA, $p < 0,05$). V Fe deficientní variantě byly postranní kořeny přítomné již ve velmi krátké vzdálenosti za kořenovou špičkou, naopak v podmínkách deficiencie dusíku byly postranní kořeny ve velké vzdálenosti za kořenovou špičkou (Graf 1; Obr 4.1).



Graf 1. Průměrné délky hlavních kořenů (HK) rostlin v jednotlivých variantách deficiencí a délky jejich nevětvených částí. Na ose x jsou jednotlivé deficiencie prvků a na ose y délka kořenů v cm. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami kultivace; modře pro celkovou délku kořene, červeně pro délku nevětvené části (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test), $p < 0,05$, $n = 3$). Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.



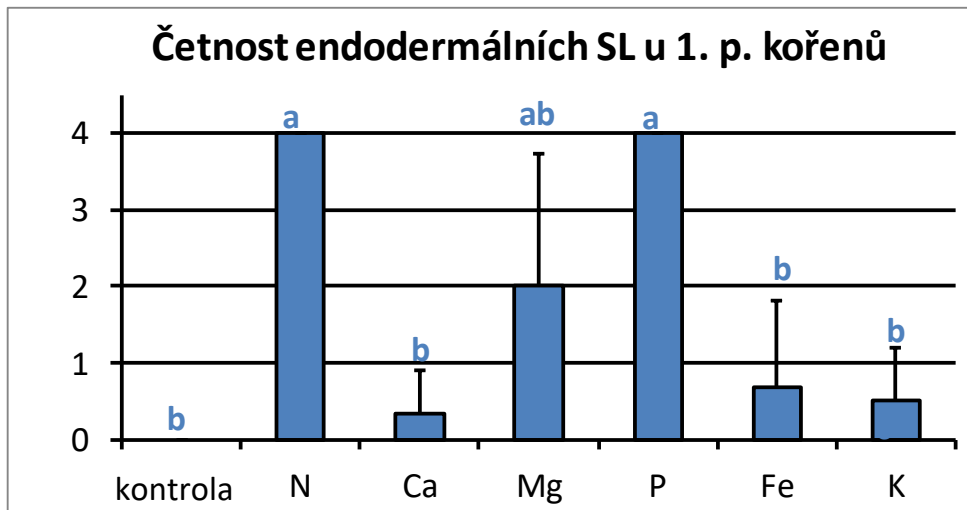
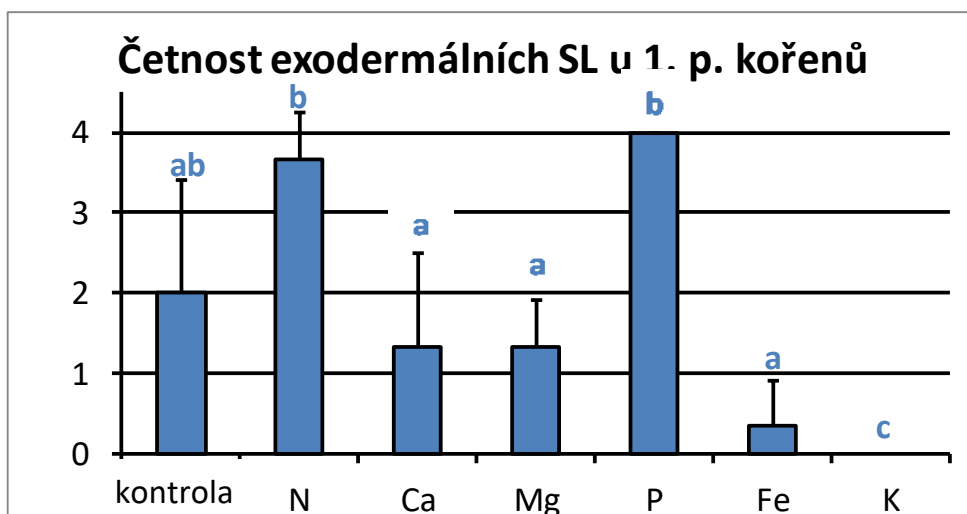
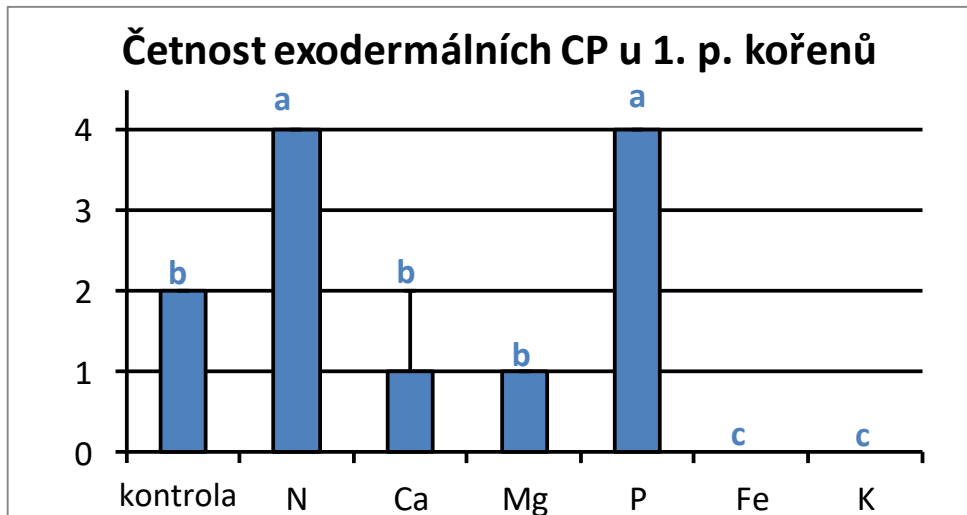
Obr 4.1 Ukázka vzhledu hlavních kořenů ve vybraných variantách, (A) kontrola, (B) kořen rostoucí v deficienci železa s velmi krátkou nevětvenou částí od špičky a krátkou celkovou délkou kořene, (C) kořen rostoucí v deficienci dusíku (měřítko = 1 cm).

4.1.1.2 Anatomická analýza kořenů

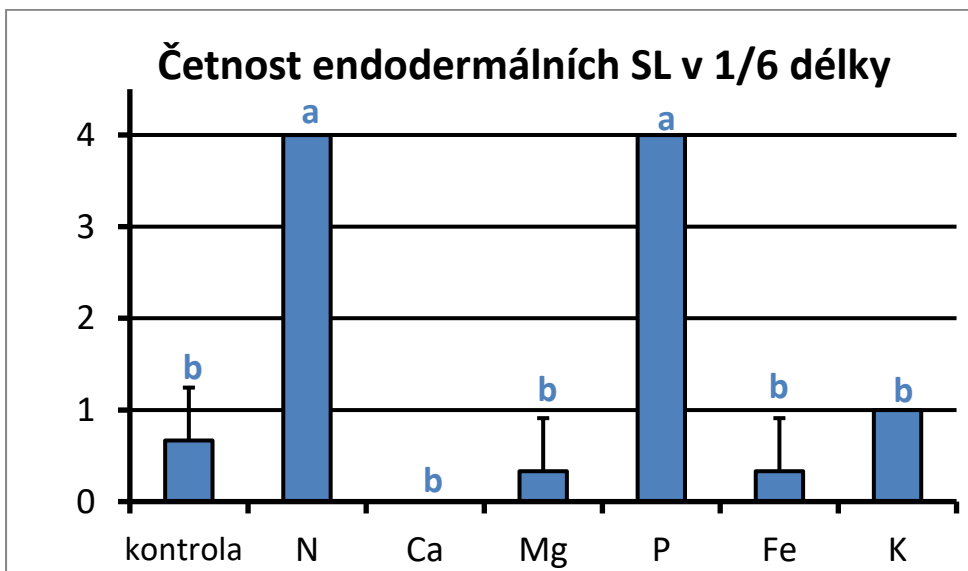
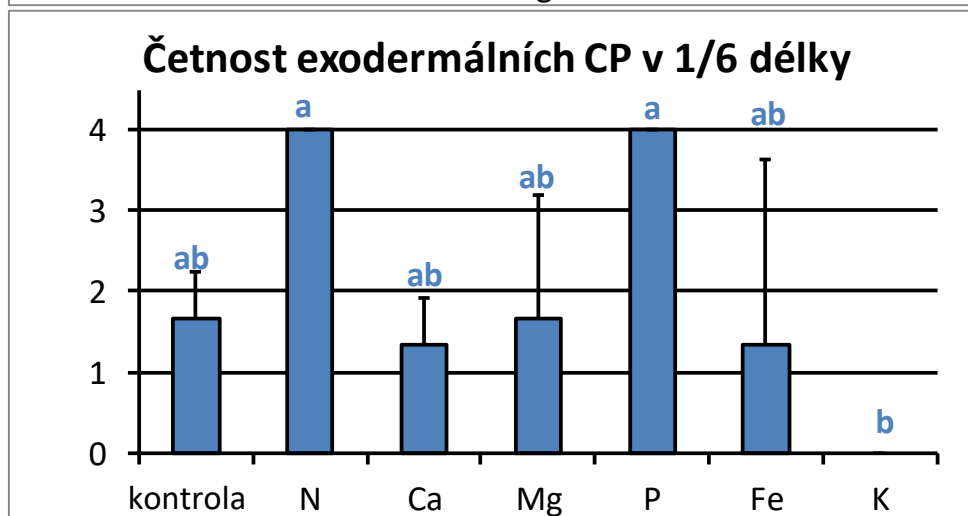
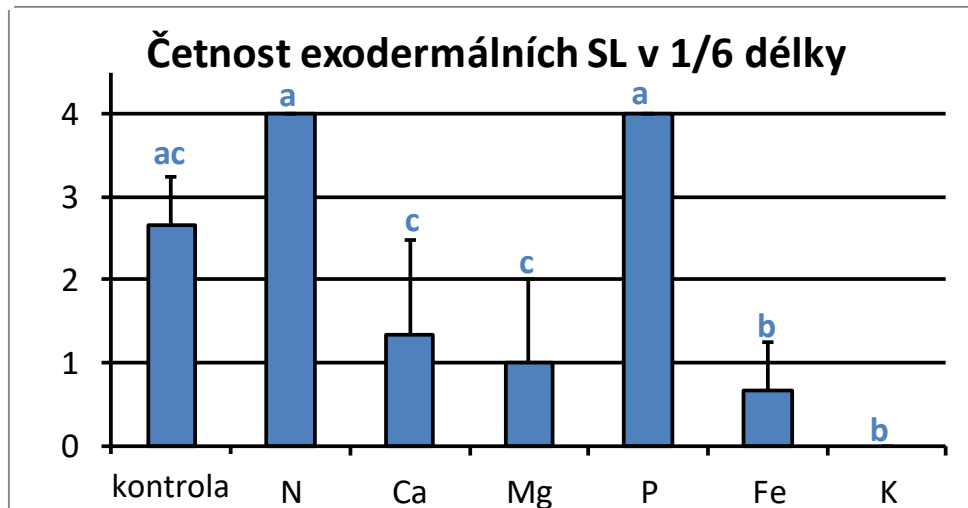
Kořeny rostoucí v jednotlivých deficiencích vykazovaly různý rozsah diferenciacie exodermis i endodermis. Deficience dusíku a fosforu výrazně urychlily maturaci exodermis, naopak deficience železa a draslíku vedla ke zpoždění maturace. Nejvíce jsou tyto rozdíly patrné na řezech v mladších částech kořene, tj. v $\frac{1}{6}$ délky kořene od špičky a v místě prvních prorůstajících postranních kořenů 1. řádu. Zde ve variantě deficientní na dusík je exodermis plně vyvinuta, zatímco varianta Fe a K deficientní nemá exodermis téměř vůbec diferencovanou (Obr. 4.2). Podobně je to i u endodermis (Obr. 4.3)

Pro kvantifikaci rozsahu diferenciacie apoplastických bariér byla provedena podrobná analýza četnosti CP v exodermis a SL v exodermis i endodermis na řezech podrobených histochemickému barvení. Četnosti byly vyjádřeny pomocí kategorií. Stupeň četnosti struktur apoplastických bariér je hodnocen kategoriemi 0 – 4 (viz tab. 3.2 v kapitole Metodika)

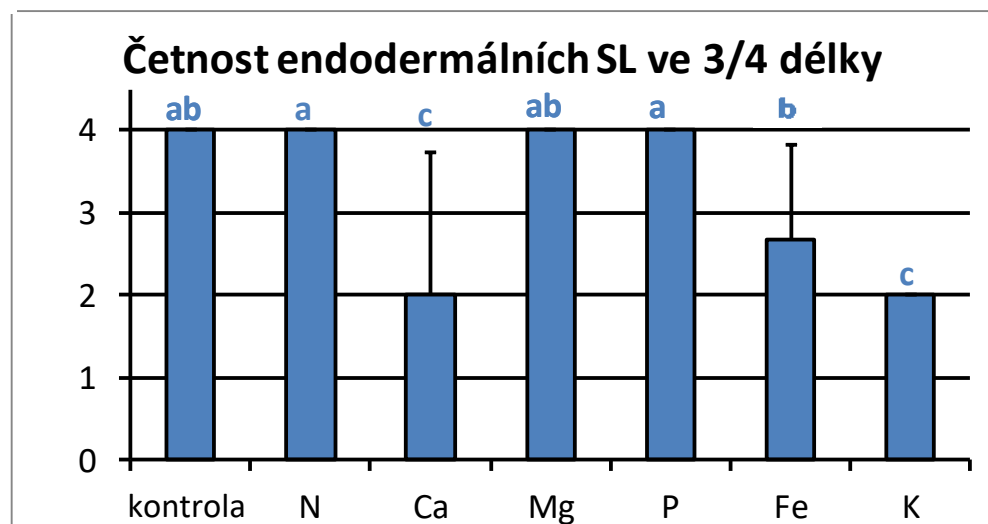
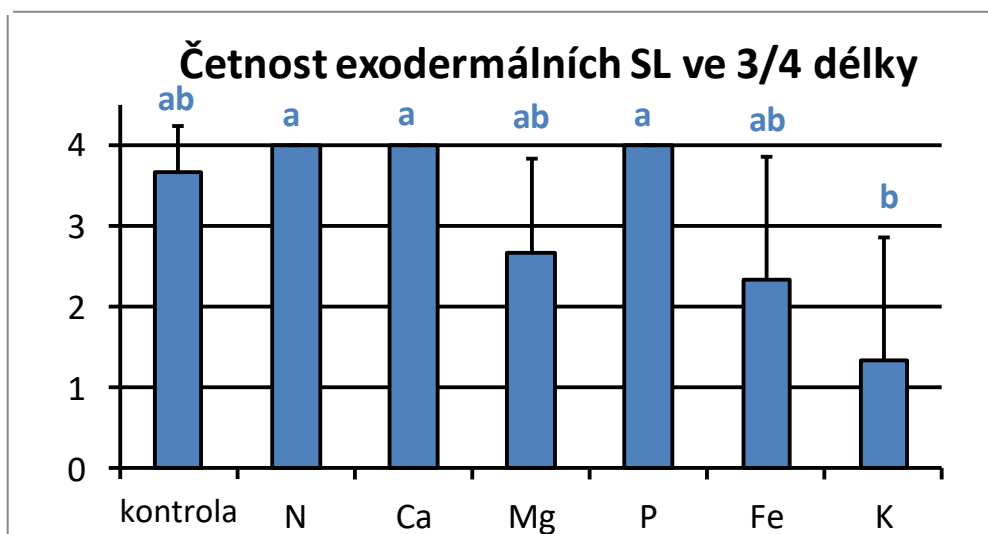
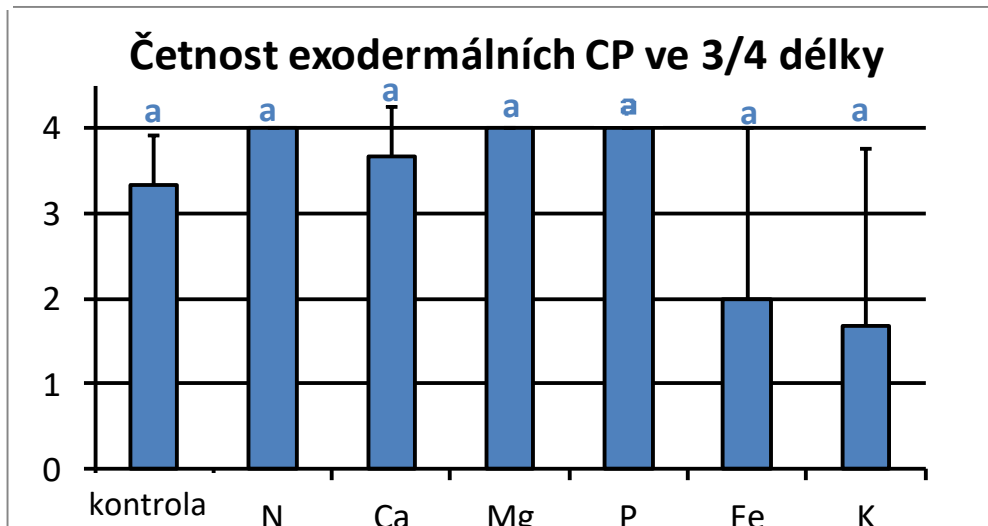
Hodnocení rozsahu diferenciacie bylo prováděno ve třech různých pozicích podél podélné osy hlavního (primárního) kořene. CP v endodermis byly (i když jen jako tečky) viditelné v celém kruhu v každé analyzované pozici, tj. četnost vždy v kategorii 4, z tohoto důvodu není tato četnost vyobrazena v grafech. V oblasti prvních postr. kořenů je jasně patrný rozdíl v rychlosti diferenciacie jednotlivých variant. Nejrychleji diferencované byly kořeny z N a P deficience (Graf 2-4). Druhá měřená oblast byla v $\frac{1}{6}$ kořene, kde je situace podobná (Graf 5-7). A třetí poslední oblastí byla ve $\frac{3}{4}$ kořene (tj. bazální část), kde již většinou byly všechny apoplastické bariéry ve všech variantách diferencované, krom Fe a K deficientních kořenů (Graf 8-10.). Nejrychlejší postup diferenciacie byl tedy u variant deficientních na dusík a fosfor, naopak nejpomalejší diferenciacie byla pozorována u variant deficientních na železo a draslík. Z toho vyplývá, že stupeň diferenciacie bariér nekoreloval s délkou kořene, protože kořeny v N deficientní variantě byly mnohem delší než kořeny ve variantě P deficientní (viz výše; Pearsonův korelační koeficient = 0,29, $p > 0,05$).



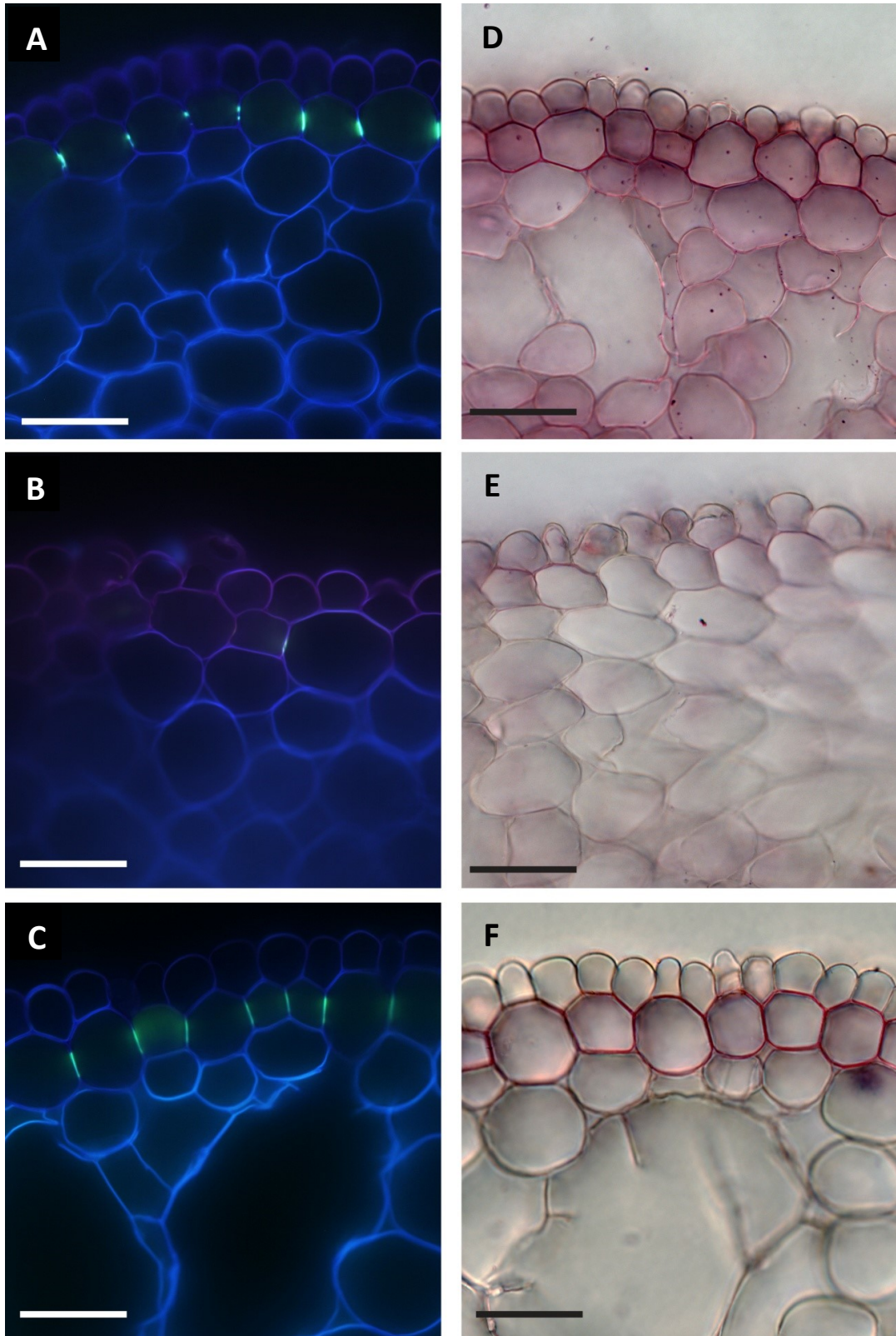
Grafy 2-4. Průměrné četnosti (kategorie 0-4 dle Tab. 3.2) diferencovaných Casparyho proužků (CP) a suberinových lamel (SL) v hlavních kořenech. Oblastiprorůstání 1. postr. kořenů. Výrazně posílená diferenciacce ve variantách deficientních na N a P. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test), $p < 0,05$, $n = 3$). Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.



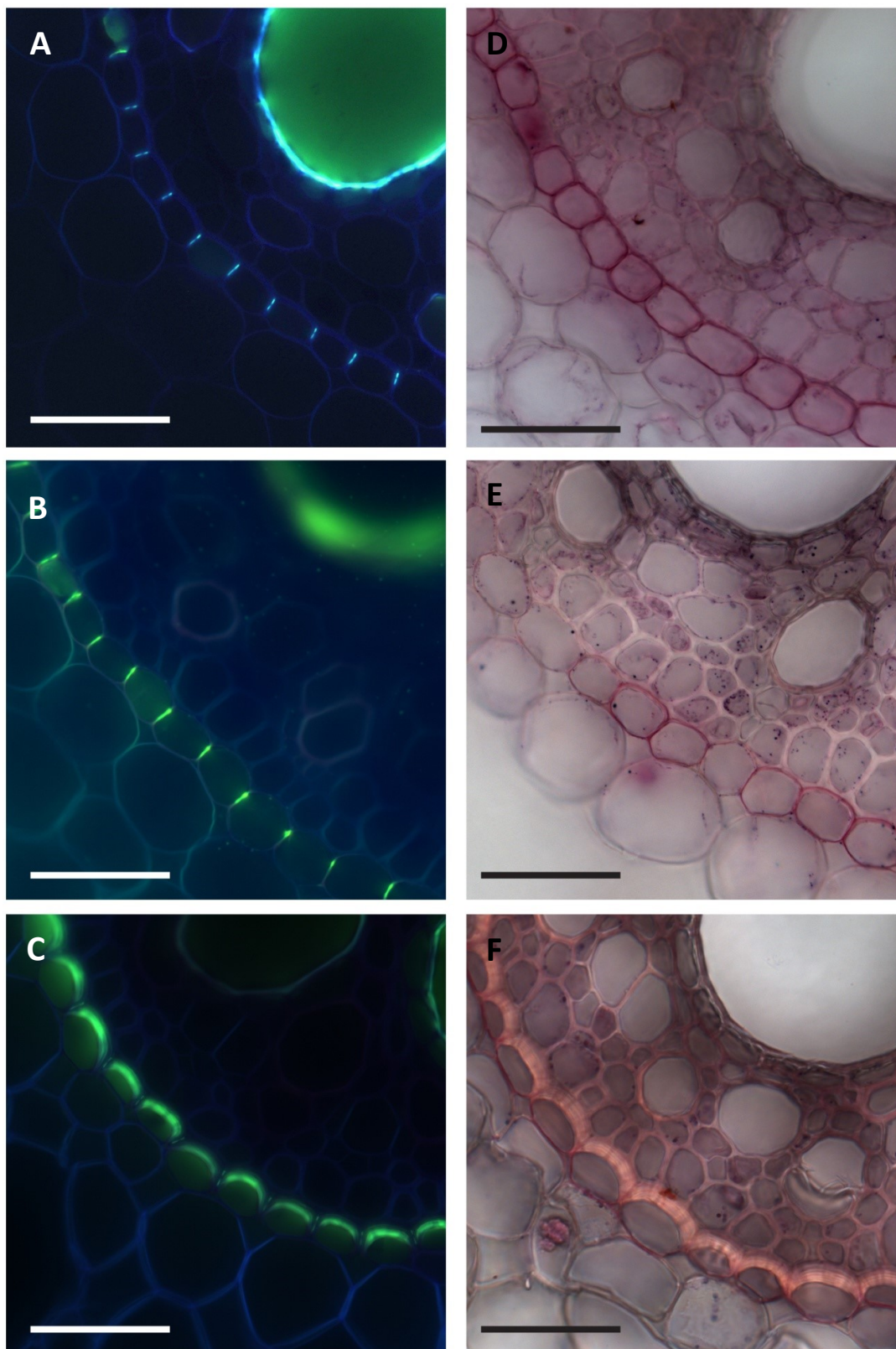
Grafy 5-7. Průměrné četnosti (kategorie 0-4 dle Tab. 3.2) diferencovaných Casparyho proužků (CP) a suberinových lamel (SL) v hlavních kořenech. $1/6$ od kořenové špičky. Výrazná diference CP i SL u variant deficientních na N a P. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p < 0,05$, $n = 3$).



Grafy 8-10. Průměrné četnosti (kategorie 0-4 dle Tab. 3.2) CP a SL Hodnoceno ve $\frac{3}{4}$ délky od kořenné špičky. Diferenciace apoplastických bariér začíná být rovnocenná u všech variant krom Fe a K deficience. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test), $p < 0,05$, $n = 3$).



Obr. 4.2 Diferenciace exodermis. Řezy ve $\frac{3}{4}$ hlavního kořene barvené (vlevo A-C) berberinem a genciánovou violetí pro zvýraznění CP, (vpravo D-F) sudanem pro zvýraznění SL. (A, D) kontrola, (B,E) -Fe varianta s málo vyvinutou exodermis, (C,F) -N varianta s velmi diferencovanou exodermis (měřítko= 50 μ m).



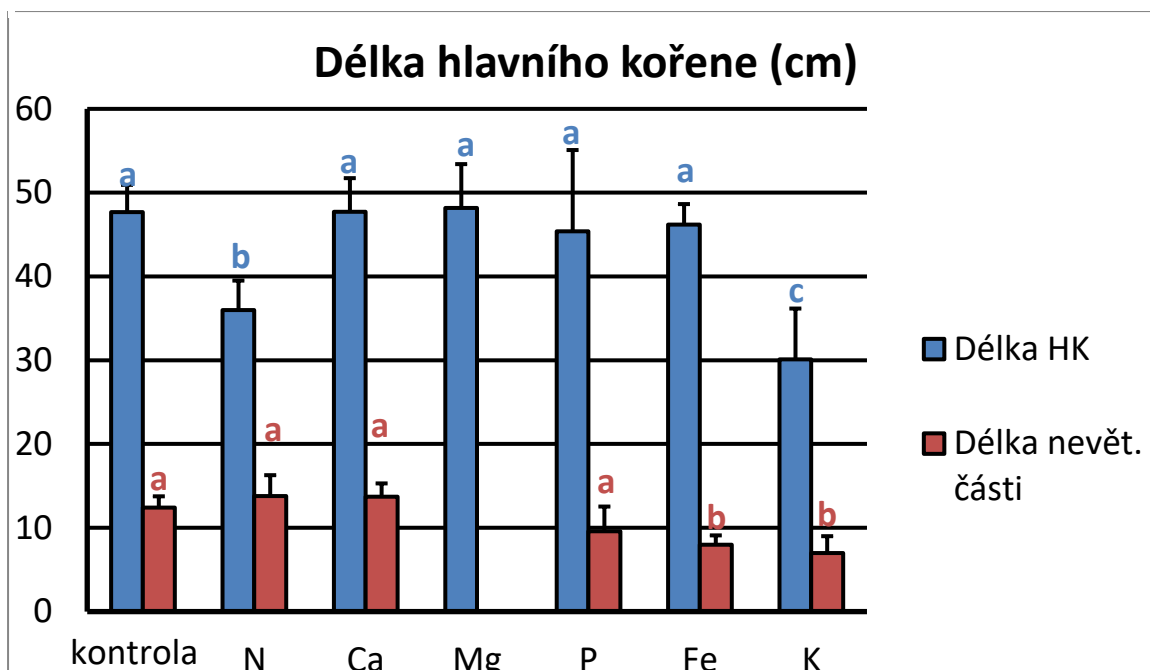
Obr. 4.3 Diferenciace endodermis. Řezy ve $\frac{3}{4}$ hlavního kořene barvené (vlevo A-C) berberinem pro zvýraznění CP, (vpravo D-F) sudanem pro zvýraznění SL. (A,D) kontrola, (B,E) –Fe varianta s málo vyvinutou endodermis, (C,F) –N varianta s velmi diferencovanou endodermis (měřítko= 50 μ m).

4.1.2 Experiment 1.2

V tomto experimentu šlo hlavně o zopakování a ověření předešlé kultivace a zvýšení počtu opakování. Hodnocení opět probíhalo ve třech pozicích podél hlavní osy primárního kořene, tentokrát v $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{6}$ délky kořene od špičky. Oblast prvních prorůstajících postranních kořenů byla vypuštěna, neboť se tato pozice často překrývala s pozicí $\frac{1}{6}$.

4.1.2.1 Morfologická analýza kořenů

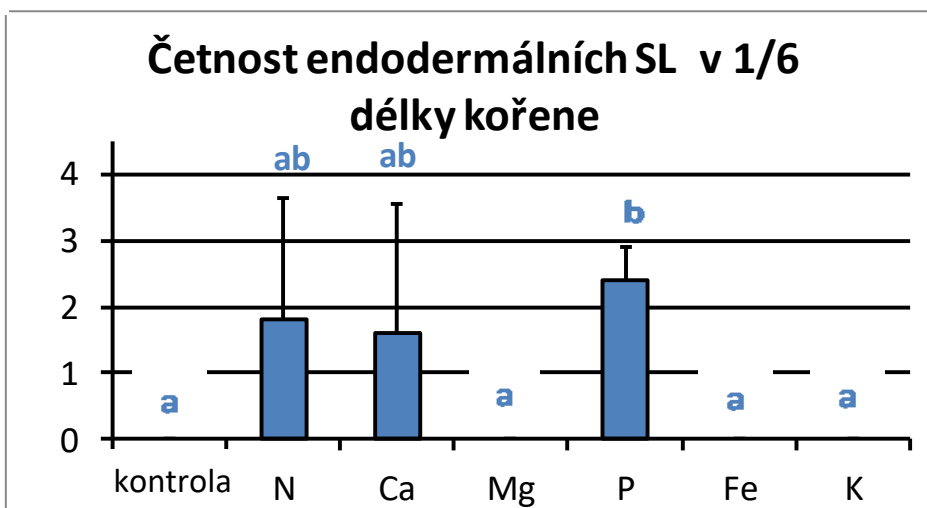
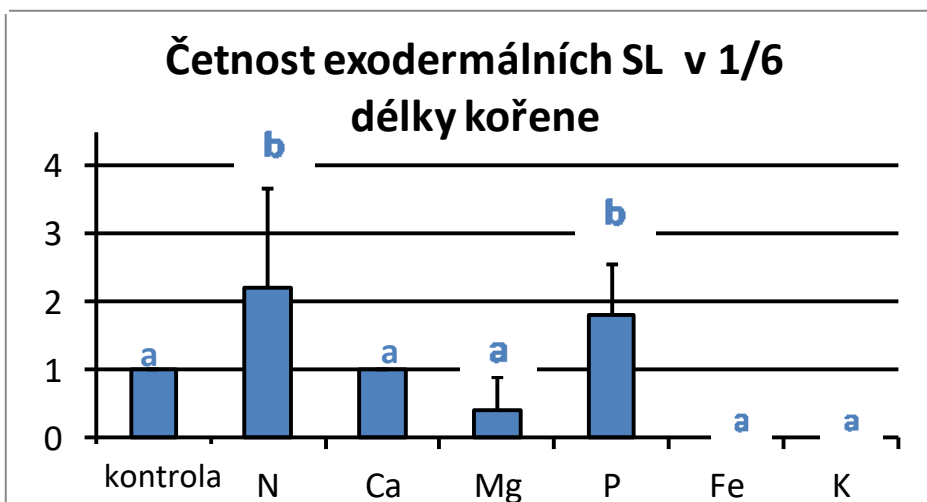
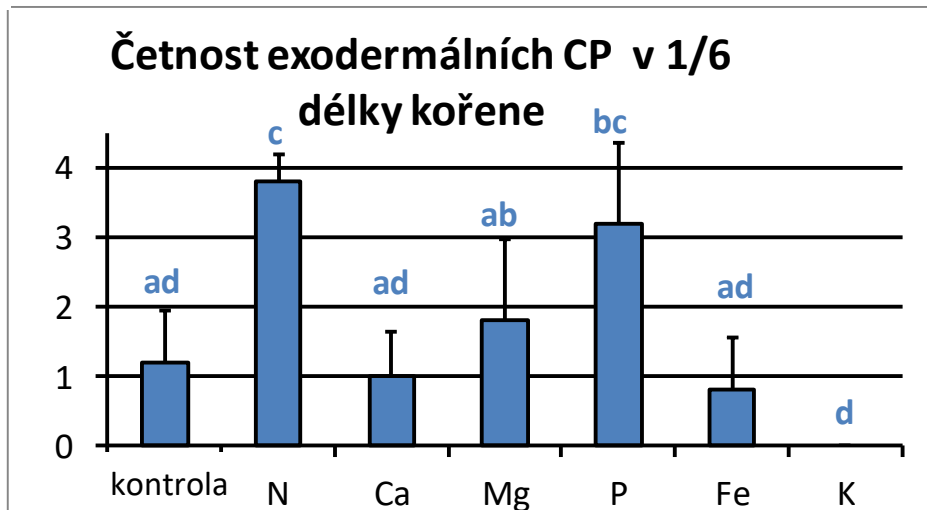
Experiment probíhal stejně jako předešlý (viz morfologická analýza kořenů v experimentu 1.1). Rostliny kukuřice (*Zea mays* L.) rostoucí v jednotlivých deficiencích opět vykazovaly různou délku hlavních kořenů stejně jako v předešlém experimentu, ale v tomto případě byly kořeny z varianty deficientní na dusík mnohem kratší než v prvním experimentu. Významně se u těchto kořenů také lišily délky nevětvených částí (Graf 11.; ANOVA, $p > 0,05$), i když rozdíly byly menší než v experimentu 1. Fe deficientní varianta měla postranní kořeny opět přítomné již ve velmi krátké vzdálenosti za kořenovou špičkou, naopak deficiencie dusíku se tentokrát v délce nevětvené části nelišila od kontrolní ani P deficientní varianty (Graf 11.; ANOVA, $p > 0,05$).



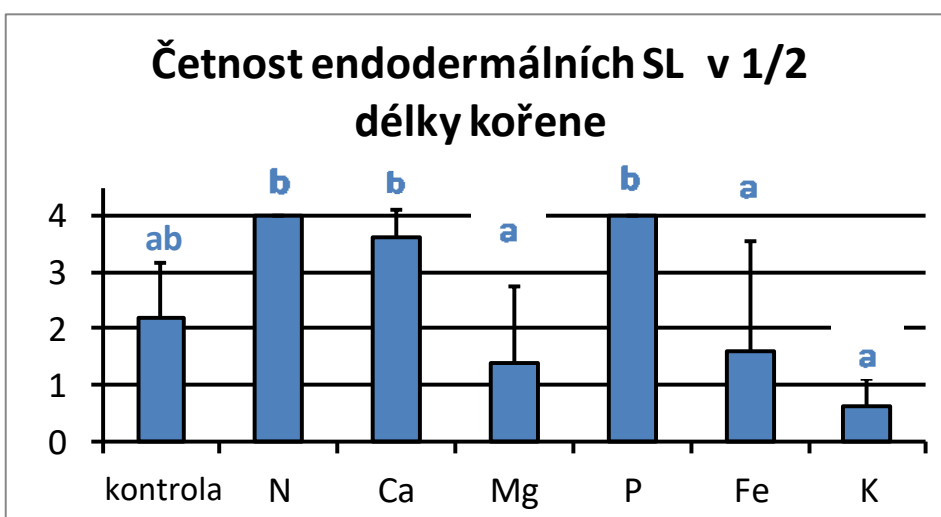
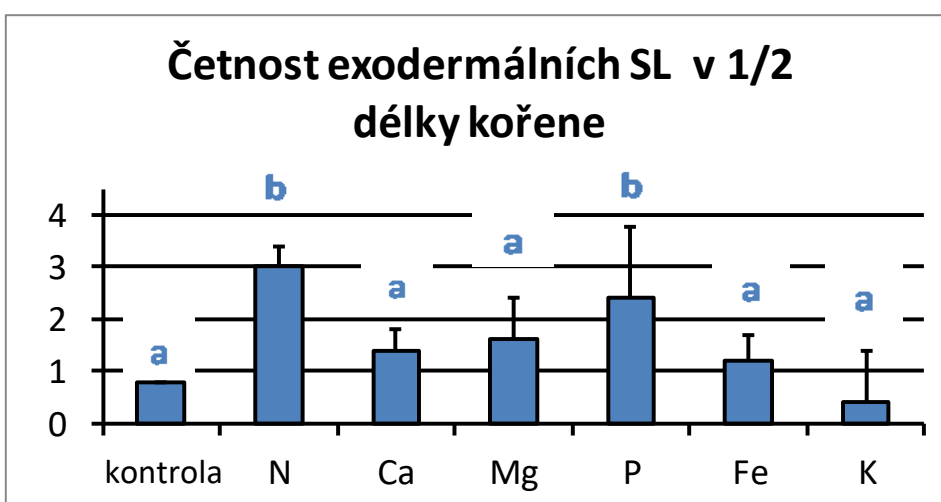
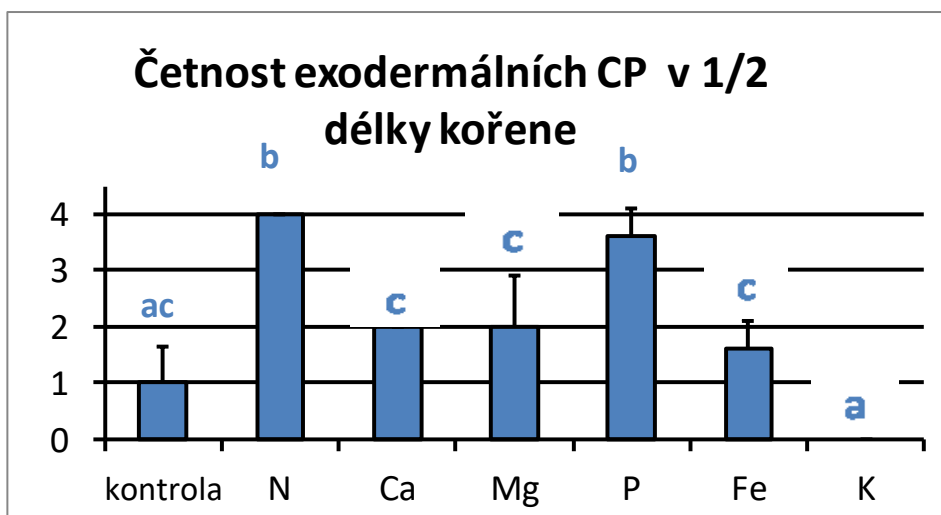
Graf 11. Průměrné délky hlavních kořenů a délky jejich nevětvených částí v jednotlivých variantách. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami; modře pro celkovou délku kořene, červeně pro délku nevětvené části. (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test), $p < 0,05$, $n = 5$). U varianty deficientní na hořčík chybí data pro délku nevětvené části Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.

4.1.2.2 Anatomická analýza kořenů

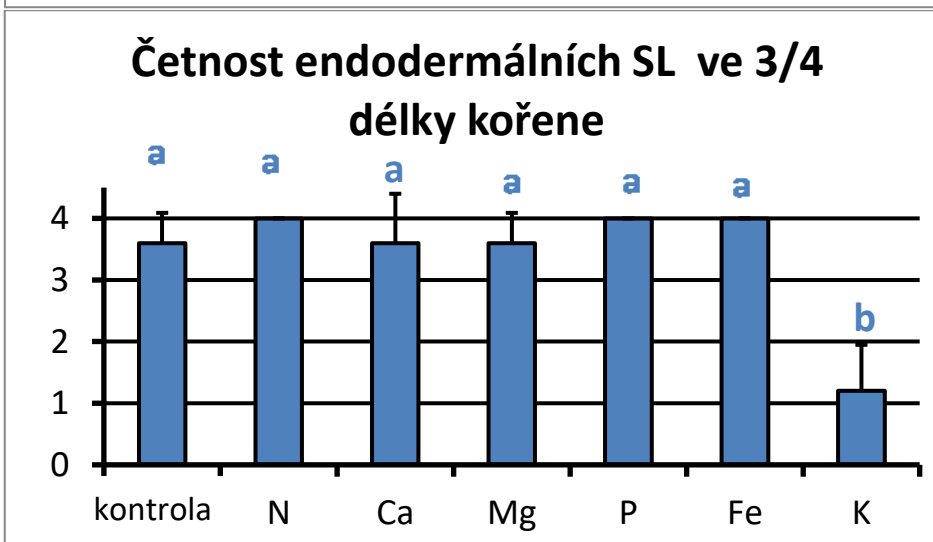
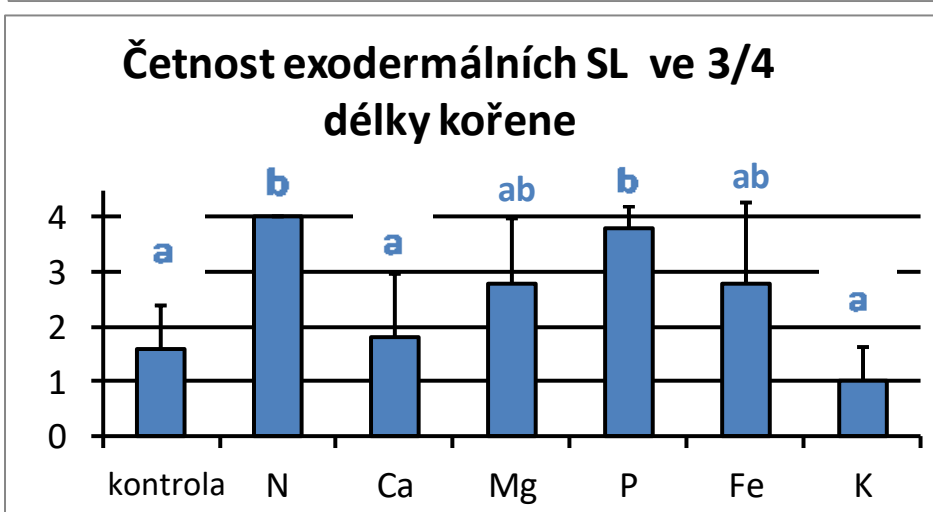
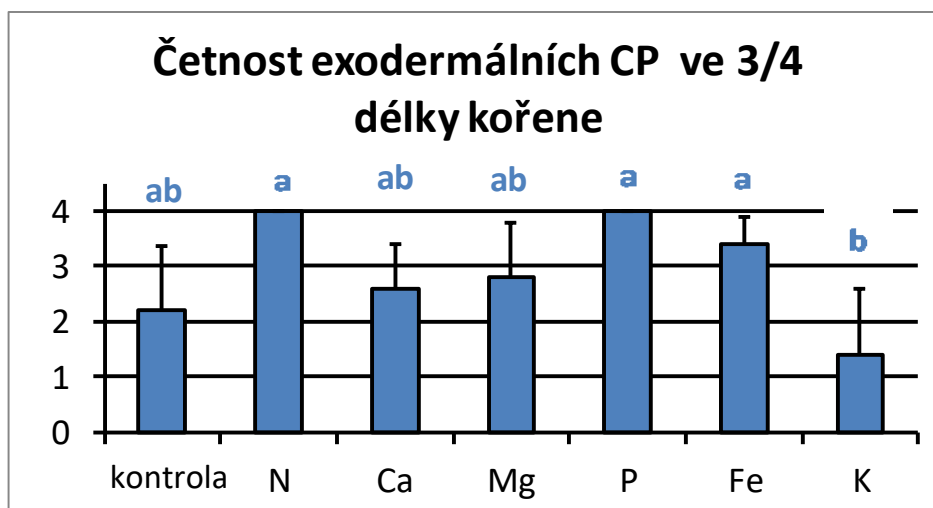
Kořeny při jednotlivých deficiencích opět vykazovaly různý rozsah diferenciac exodermis podobně jako v experimentu 1.1. Deficience dusíku a fosforu výrazně urychlily maturaci exodermis, naopak deficience železa a draslíku vedla ke zpoždění maturace. Rozdíly mezi variantami byly opět patrné především v mladších částech kořene, tj. v $\frac{1}{6}$ a $\frac{1}{2}$ (Graf 12-17, Obr 4.4 a 4.5). Poslední pozorovanou pozicí byla stejně jako v předešlém experimentu $\frac{3}{4}$ kořene. V této pozici jsou již rozdíly mezi variantami méně patrné (Graf 18-20), podobně jako v předchozím experimentu. Pro hodnocení rozsahu diferenciac byly použity kategorie četnosti 0 - 4 dle tabulky 3.2 (kapitola Metodika).



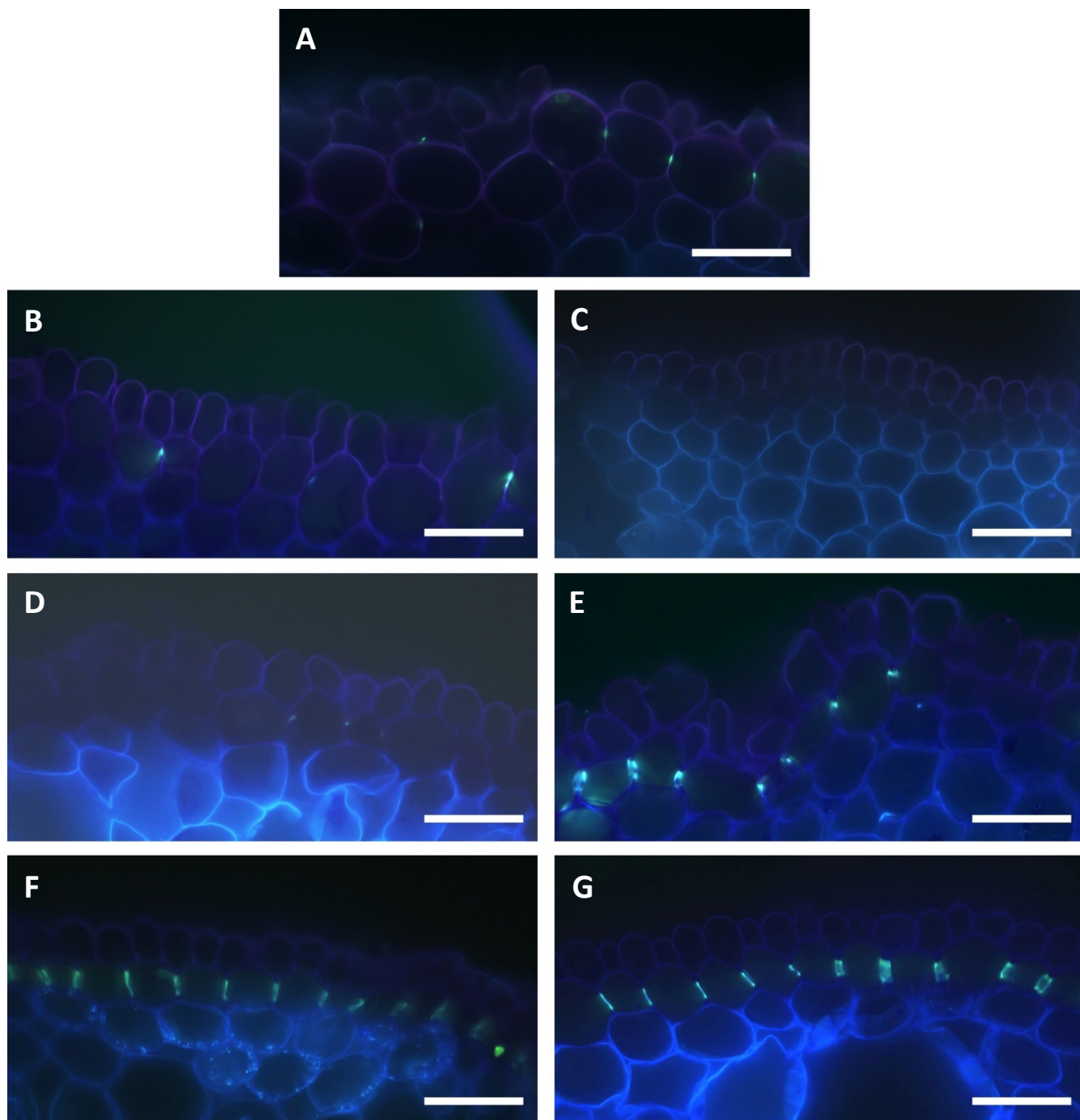
Grafy 12-14. Průměrné četnosti (kategorie 0-4 dle Tab. 3.2) diferencovaných CP a SL v hlavních kořenech. Hodnoceno v $1/6$ délky od kořenevé špičky. V této pozici ještě nejsou příliš diferencované SL kromě deficiencí N a P. CP začínají v exodermis diferencovat ve všech variantách kromě K. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test), $p < 0,05$, $n = 5$).



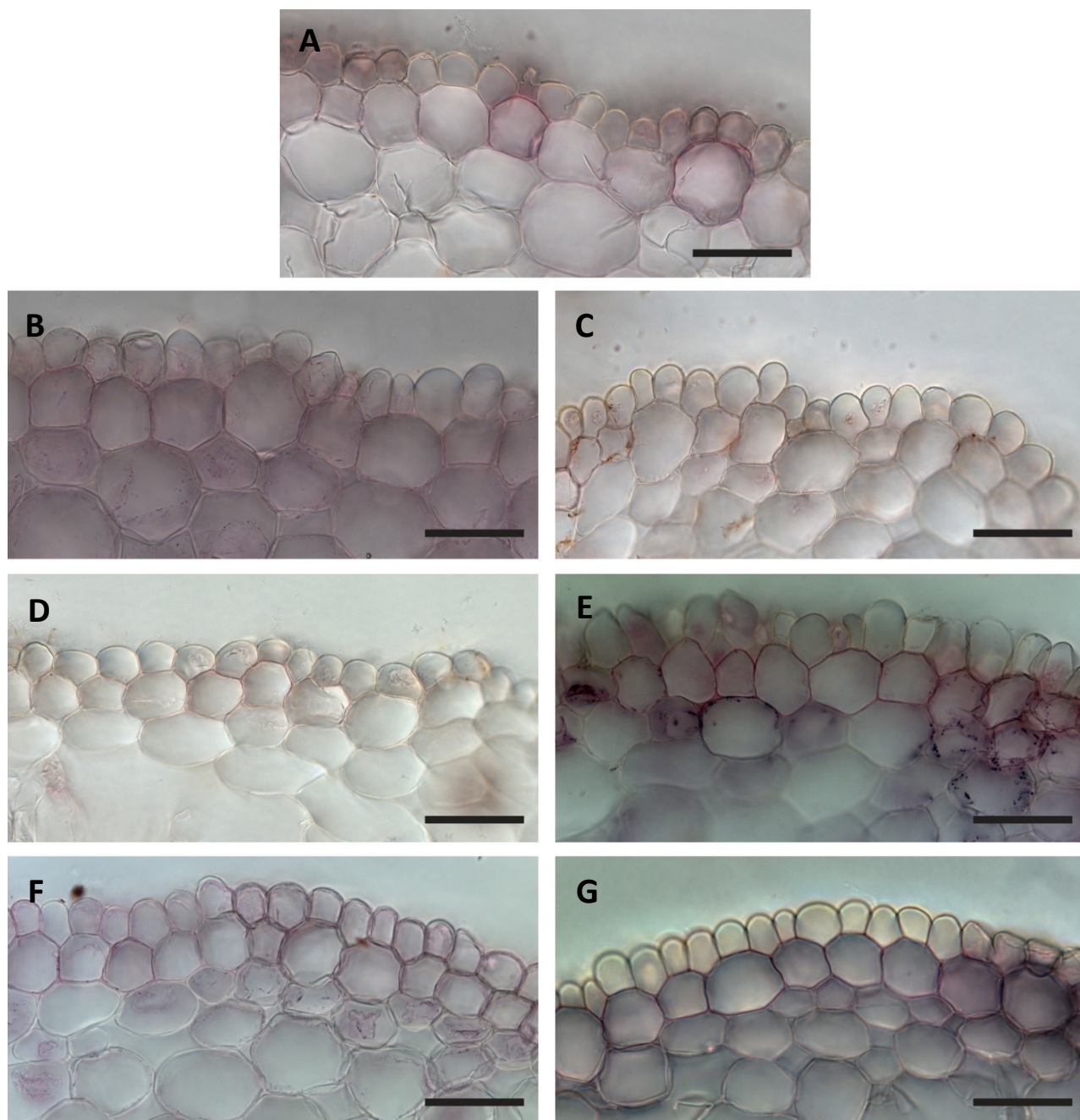
Grafy 15-17. Průměrné četnosti (kategorie: Tab. 3.2) diferencovaných Casparyho proužků (CP) a suberinových lamel (SL) v hlavních kořenech. Hodnoceno v 1/2 kořene. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi /variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test), $p < 0,05$, $n = 5$). Chybové úsečky ukazují standardní chybu průměru.



Grafy 18-20. Průměrné četnosti (kategorie: Tab. 3.2) CP a SL v hlavních kořenech ve $\frac{3}{4}$ vzdálenosti od kořenové špičky. V této pozici mají již všechny varianty diferencované SL a CP, v endodermis více než v exodermis. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p < 0,05$, $n = 5$). Chybové úsečky ukazují standardní chybu průměru.



Obr. 4.4 Diferenciace exodermis. Řezy v $\frac{1}{6}$ hlavního kořene barvené berberinem a genciánovou violetí pro zvýraznění CP. (A) kontrola, (B) -Fe varianta a (C) -K s velmi málo vyvinutou exodermis, (D) -Ca varianta a (E) -Mg varianta se střední četností exodermis, (F) -N varianta a (G) -P varianta s velmi silně vyvinutou exodermis (měřítko= 50 μm).



Obr. 4.5 Diferenciace exodermis. Řezy v $\frac{1}{6}$ hlavního kořene barvené sudanem pro zvýraznění SL. (A) kontrola, (B) $-Fe$ varianta a (C) $-K$ varianta s velmi málo vyvinutou exodermis, (D) $-Ca$ varianta a (E) $-Mg$ varianta se střední četností exodermis, (F) $-N$ varianta a (G) $-P$ varianta s velmi silně vyvinutou exodermis (měřítko= 50 μm).

4.1.3 Shrnutí experimentu 1.1 a 1.2

Výsledky obou výše zmíněných experimentů ukazují na velmi vysokou plasticitu vývoje nejen exodermis, ale i endodermis. Endodermis se diferencuje blíže za kořenovou špičkou

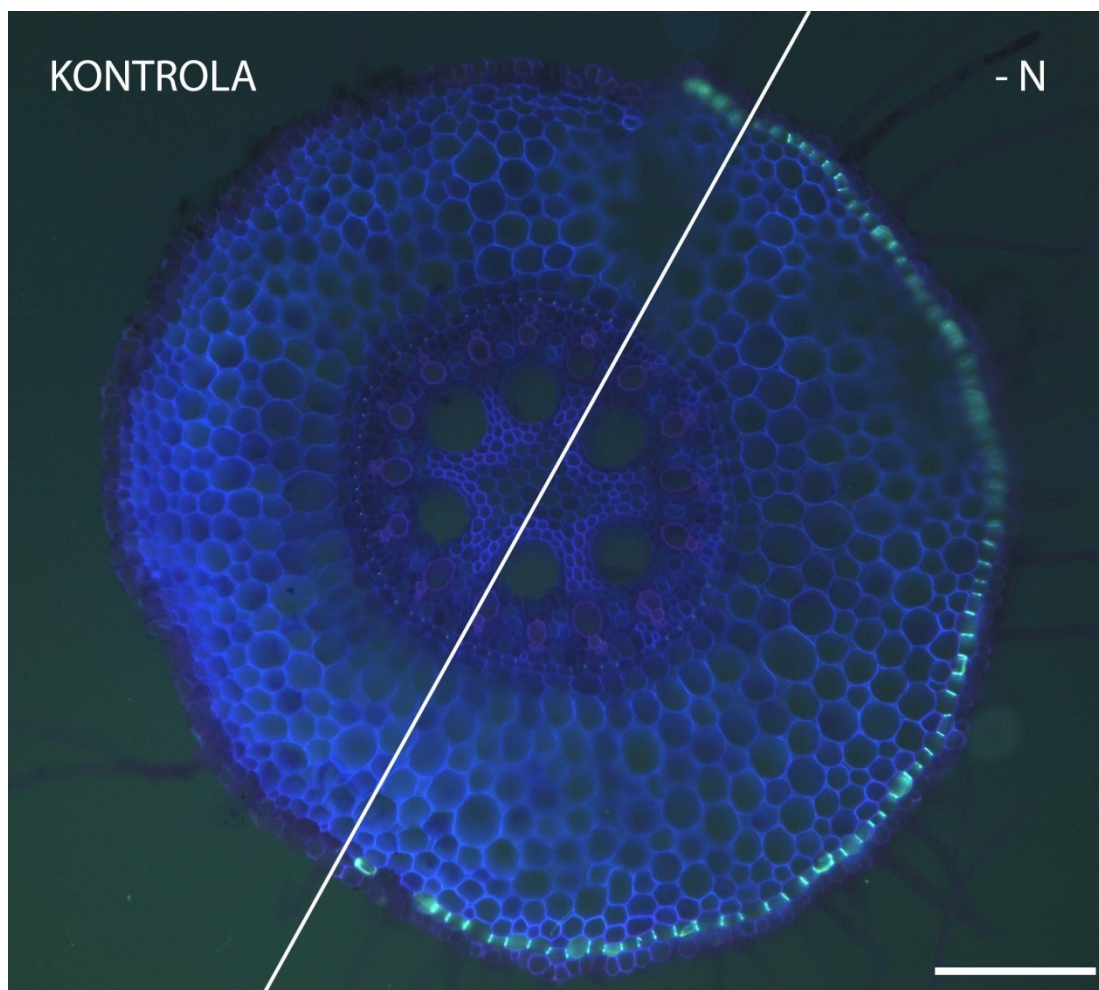
u deficiencí N a P. Naopak u K a Fe deficiencie se diferencuje později (dále za špičkou) v porovnání s kontrolní variantou. Podobně je tomu i u exodermis.

4.2 Analýza vlivu lokálního nedostatku živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté (kultivace „sendvičovou“ metodou)

Cílem této části práce bylo vyhodnotit lokální působení nedostatku živin (konkrétně dusíku) na diferenciaci kořenových pletiv. Rostliny kukuřice (*Zea mays* L.) byly po naklíčení v rámci každého experimentu krátkodobě kultivovány (3 dny) mezi vrstvami agaru o různé dostupnosti N a byla hodnocena diferenciaci exodermis v nově přirostlé části primárního kořene. Pomocí této kultivační metody lze pozorovat lokální působení podmínek na diferenciaci kořenových pletiv. V následujícím textu výsledků je vždy agar s kompletní dostupností živin označen K (kontrola), agar s vynechaným přídatkem dusíku jako N (deficience dusíku), více viz. kap. Metodika.

4.2.1 Experiment 2. 1. - Kultivace celistvých rostlin mezi vrstvami agaru K/N

Během 3 denní kultivace rostlin mezi agarovými vrstvami se délka hlavního kořene zvětšila z původních 5 cm na $20,8 \pm 2,77$ cm, přírůstek tedy činil průměrně $15,8 \pm 1,73$ cm ($n=7$). Anatomická analýza ukázala, že detekovatelné exodermální CP se u těchto kořenů vyskytují až ve vzdálenosti 9-10 cm od špičky. U některých kořenů bylo navíc pozorováno, že se vytvářel půlkruh diferencované exodermis (s CP detekovatelnými histochemickým barvením) na straně přiléhající k agaru bez dusíku (Obr. 4.6.). Byl proto proveden následující experiment (experiment 2.2., viz dále), kde byl výskyt diferencované exodermis hodnocen podrobněji a byla zařazena také varianta K/K (s oběma agarovými vrstvami o stejné dostupnosti dusíku).



Obr. 4.6 Důsledek lokalizovaného působení na diferenciaci exodermálních CP. Barveno berberinem a genciánovou violetí pro zvýraznění CP. Bílá čára rozděluje řez na poloviny podle obsahu živin, ve kterých kořen rostl. Vlevo kontrola vpravo část deficientní na N (měřítko= 100 μm).

4.2.2 Experiment 2. 2. - Kultivace celistvých rostlin mezi vrstvami agaru K/N a K/K s podrobným hodnocením frekvence výskytu apoplastických bariér

Tento experiment byl téměř stejný jako ten předešlý. Rostliny ale byly kultivovány ve dvou variantách: mezi vrstvami agaru s identickým obsahem dusíku, tj. 3,75 mM NO_3^- (K/K) a mezi vrstvami agaru, kdy dusík v jedné z nich chyběl (K/N). V tomto případě, mimo sledování začátku diferenciace apoplastických bariér, byla také podrobně provedena analýza rozsahu jejich diferenciace (četnosti CP a SL v rámci endodermální a exodermální vrstvy) v různých vzdálenostech za špičkou v rámci nově přirostlé části kořene.

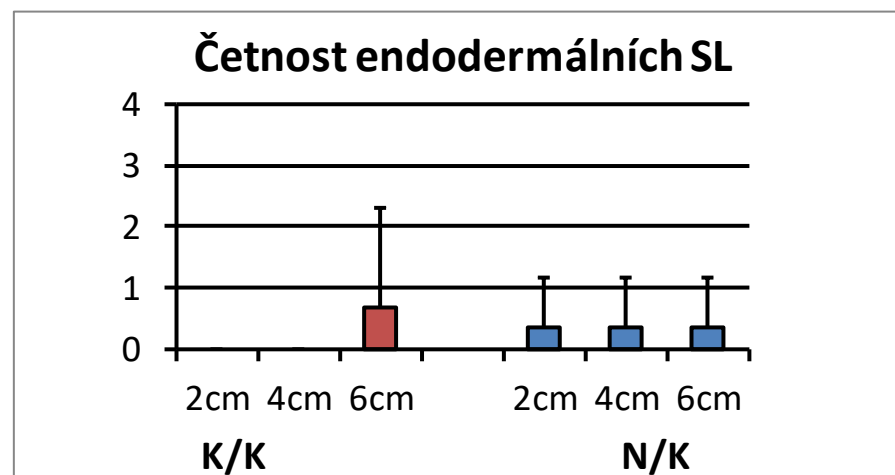
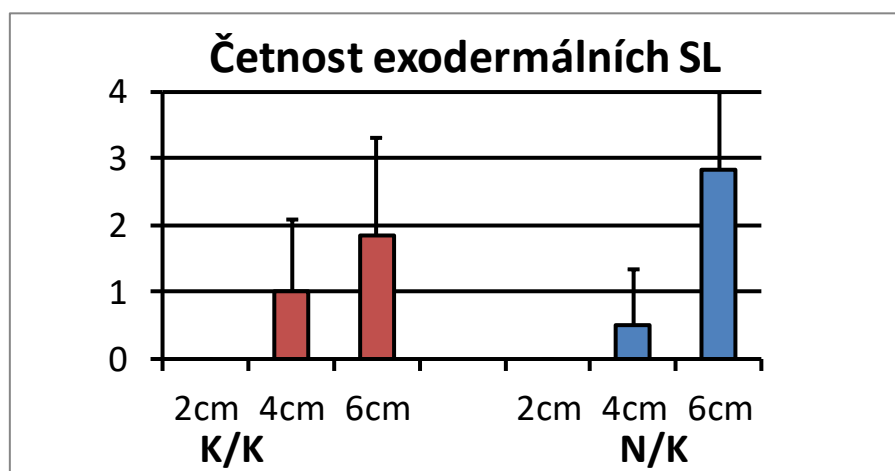
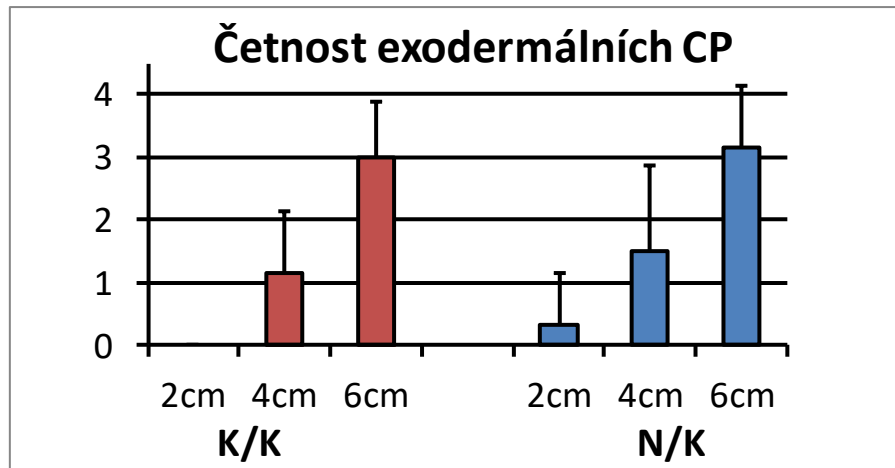
Hodnocení růstu ukázalo, že se během kultivace přírůstky nadzemní ani podzemní části mezi variantami od sebe příliš nelišily (viz tab. 4.1), (*ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p > 0,05, n = 6$*).

Varianta	Délka kořene při nasazení rostlin	Délka nové části kořene	Celková délka kořene po kultivaci	Délka nadzemní části
K/K	1,2±0,45	7,5±2,36	8,7±2,31	2,6± 0,28
K/N	2±0,48	7,9±1,27	8,1±1,31	2,7±0,48

Tab. 4.1 Průměrné délky částí rostlin (cm). K/K – kontrolní agary, K/N – kontrolní a na dusík deficientní agar.

Vliv lokalizovaného působení rozdílné dostupnosti dusíku (pozorovaný v několika případech v experimentu 1) se nepodařilo potvrdit. Výskyt exodermálních CP nekoreloval s orientací kořene mezi agarovými vrstvami. Nebyla pozorována rychlejší diferenciací exodermis ani na straně přivrácené k agaru s kompletní dostupností živin (K) ani k agaru bez dusíku (N). Projevil se naopak vliv vzduchu v oblasti, kde kořen nebyl v přímém styku s agarovým médiem. V těchto oblastech zřejmě docházelo k mírnému vysychání vnějších pletiv kořene. Proto se zde CP, jakožto ochrana vnitřních pletiv kořene, diferencovaly rychleji než v místech, kde byla rhizodermis ve styku s agarovým médiem (Obr. 4.7). Podobný vzorec byl pozorován i pro exodermální suberinové lamely.

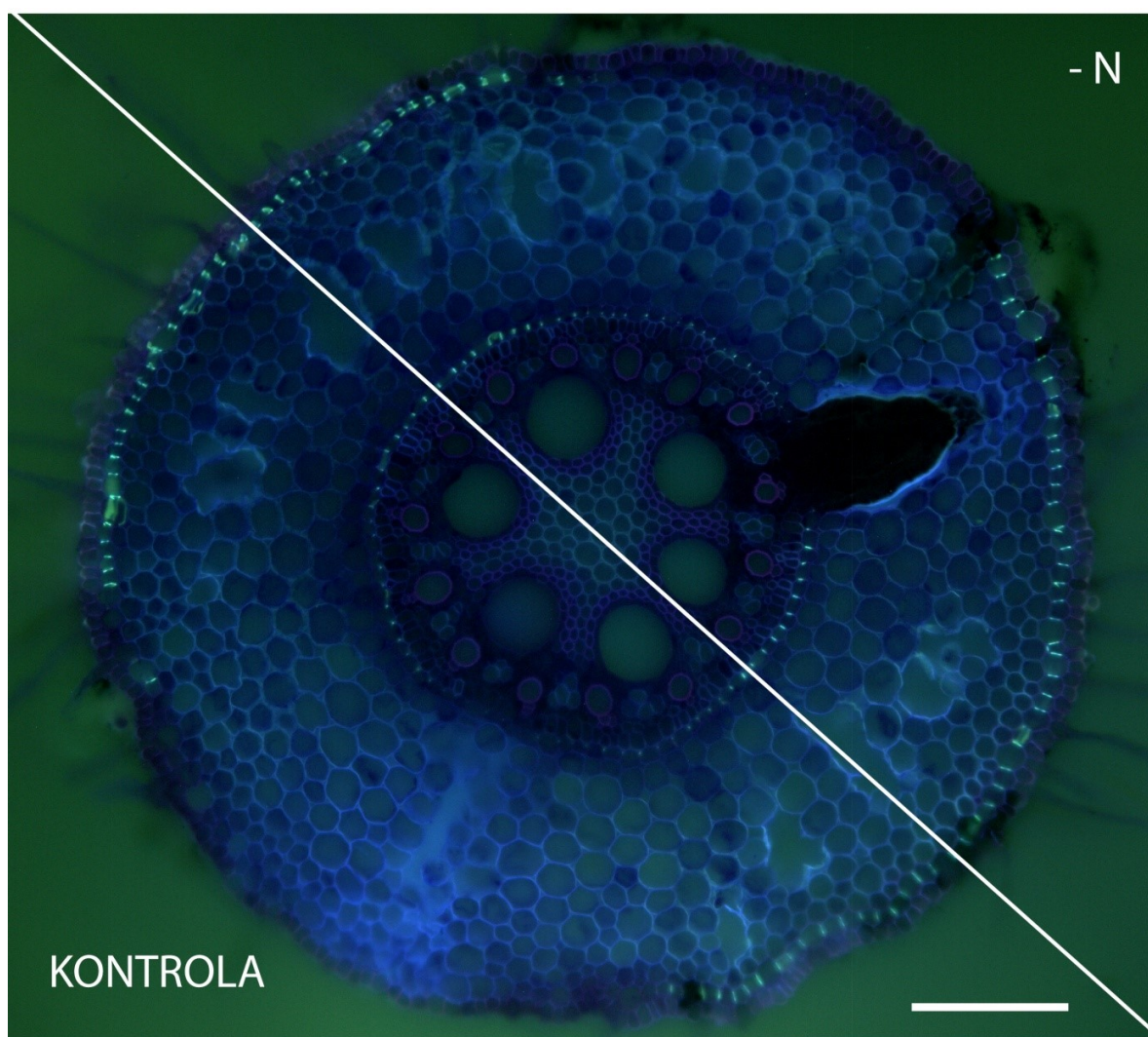
V tomto experimentu byla dále provedena podrobná analýza četnosti CP a SL v exodermis i endodermis na řezech v různé vzdálenosti za špičkou kořene (2, 4 a 6 cm za špičkou kořene). Stupeň četnosti struktur apoplastických bariér byl hodnocen podobně jako u hydroponických kultur (viz experiment 1.1 a 1.2) pomocí kategorií 0 – 4 (viz tab. 3.2 v kapitole Metodika). Z grafů je patrné, že se varianty v jednotlivých analyzovaných pozicích nelišily (Grafy 21-23). Anatomická analýza ukázala, že se vzdálenost, ve které byly pozorovány první CP nebo SL v exodermální vrstvě signifikantně nelišila mezi variantami K/K a N/K. Vzdálenosti (viz tab. 4.2)



Grafy 21-23: Četnost (kategorie 0-4 dle Tab. 3.2) diferencovaných bariér v exodermis a endodermis. Průměrné četnosti diferencovaných apoplastických bariér hlavních kořenů. Hodnoceno ve třech různých vzdálenostech od kořenové špičky. Statisticky významné rozdíly mezi variantami nebyly v tomto experimentu pozorovány v žádné analyzované pozici (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p > 0,05$, $n = 6$).

Varianta	Vzdálenost počátku tvorby CP v exo (od kořenové špičky)	Vzdálenost počátku tvorby SL v exo (od kořenové špičky)
K/K	4,7±0,94	4,8±0,98
K/N	4±1,16	4,7±1,89

Tab. 4.2 Průměrné vzdálenosti diferenciac CP a SL v exodermis (exo) za kořenovou špičkou. K/K – kontrolní agary, K/N – kontrolní a na dusík deficientní agar.



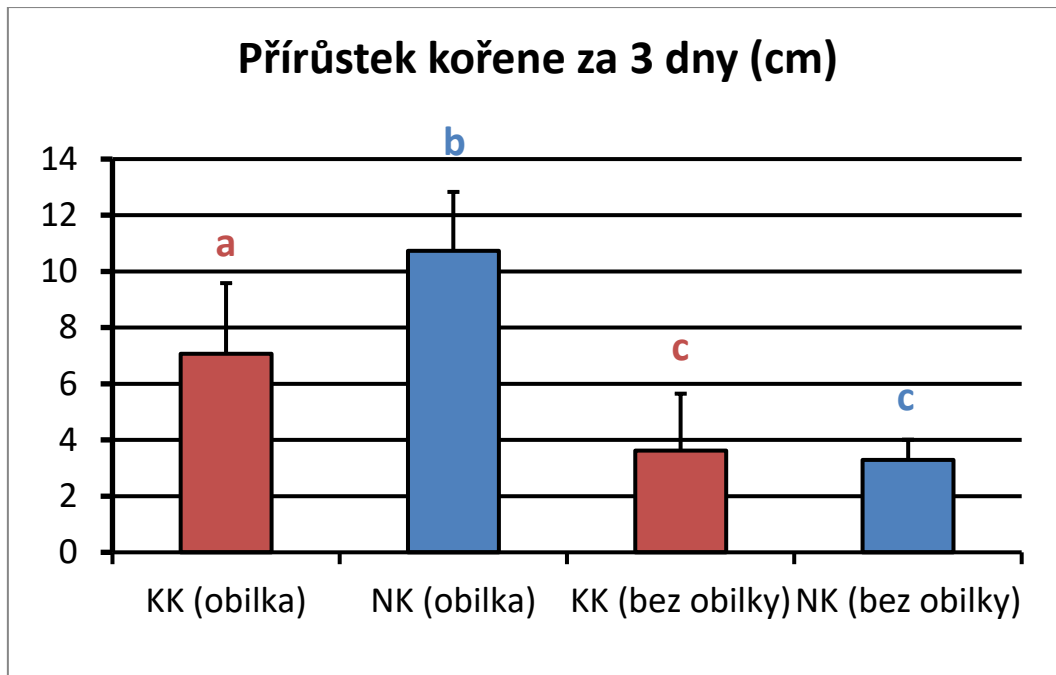
Obr. 4.7 Důsledek lokalizovaného působení na diferenciaci exodermálních CP. Diferenciac byla zřejmě posílena kvůli působení vzduchu mezi vrstvami agaru. Barveno berberinoma genciánovou violetí pro zvýraznění CP. Bílá čára rozděljuje řez na poloviny podle obsahu živin, ve kterých kořen rostl. Vlevo kontrola vpravo část deficientní na N (měřítko= 100 μ m).

4.2.3 Experiment 2. 3. - Kultivace rostlin (s obilkou/bez obilky) mezi vrstvami agaru K/N a K/K

Pro výzkum vlivu zásobních látek obsažených v obilce na růst a diferenciaci bariér byl proveden experiment, který srovnával růst a diferenciaci kořenů u celistvých rostlin rostoucích v sendviči s obilkou v porovnání s rostlinami rostoucími bez obilky. V tabulce 4.2 jsou popsány růstové parametry zkoumaných rostlin. Graf 24 ukazuje, že kořeny rostlin zbavených obilky, příliš nenarostly v žádné variantě. Ovlivnění růstu obsahem živin v mediu tedy v tomto případě nenastalo. U rostlin s obilkou byl přírůstek signifikantně větší u rostlin v N/K variantě (Tab. 4.3 a Graf 24).

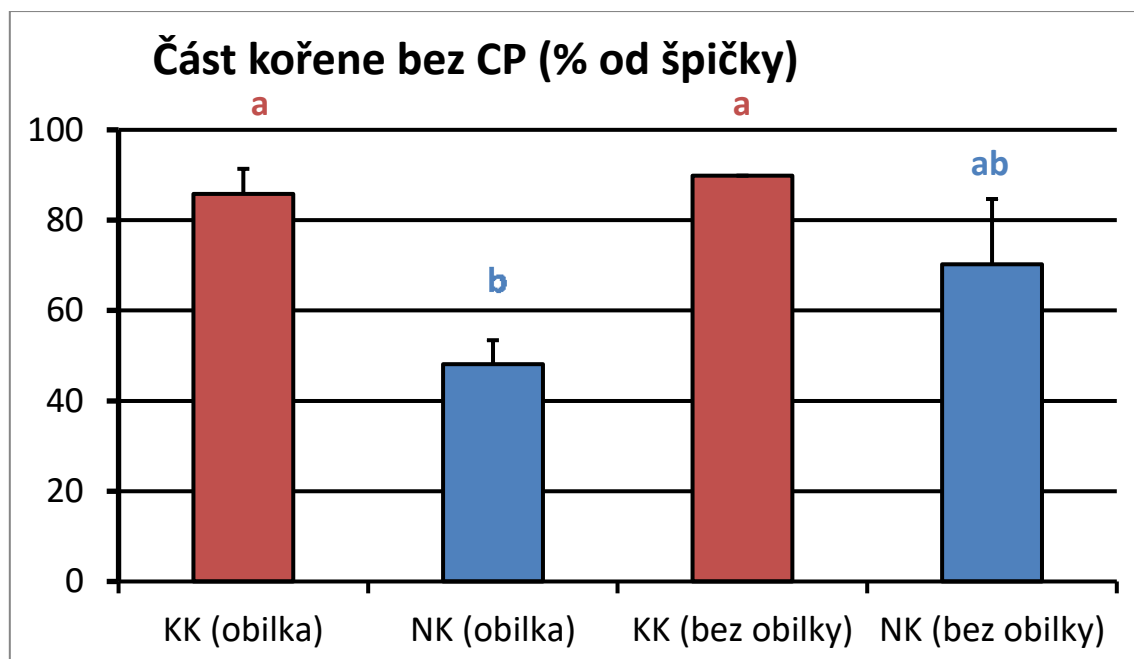
Varianta	délka kořene při nasazení rostlin	Celk.délka kořene po 3 dnech kultivace	délka nadzemní části
K/K S obilkou	3,6±0,28	10,6±2,48	4,6±0,78
K/K Bez obilky	4,7±1,42	8,3±2,9	4,3±2,27
N/K S obilkou	5±0,90	20,8±2,51	4,8±1,83
N/K Bez obilky	4,7±1,20	8±1,23	2,8±0,76

Tab. 4.3 Průměrné délky částí rostlin (cm). Varianta s kontrolním obsahem živin v obou agarových vrstvách (KK) nebo s jedním agarem bez dusíku (NK). Rostliny kultivovány s obilkou nebo bez obilky po dobu 3 dní.



Graf 24. Přírůstek hlavního kořene po třídní kultivaci v sendviči mezi oběma agary s kontrolním obsahem živin (KK) nebo s jedním agarem bez dusíku (NK). Rostliny kultivovány s obilkou nebo bez obilky. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p < 0,05$, $n = 6$). Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.

Pro analýzu byly použity jen části kořenů přirostlých v sendviči. Při měření vzdálenosti nástupu diferenciaci exodermis od kořenové špičky je vhodné vzít v úvahu i celkovou délku kořene, protože porovnávání vzdáleností nediferencovaných zón mezi variantami s různou délkou kořene může být zavádějící. Např. u varianty N/K s obilkou při hodnocení pomocí relativní vzdálenosti (v % vzdálenosti od špičky, kdy celková délka kořene = 100%), má tato varianta nejrychlejší diferenciaci CP ze všech pozorovaných variant (Graf 25). Je tedy nutné určit relativní vzdálenost, která udává rozsah nediferencované části kořene v %.



Graf 25. Délka apikální části hlavního kořene, ve které nebyly pozorovány CP v exodermis, vyjádřená v % z celkové délky kořene. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p < 0,05$, $n = 6$). Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.

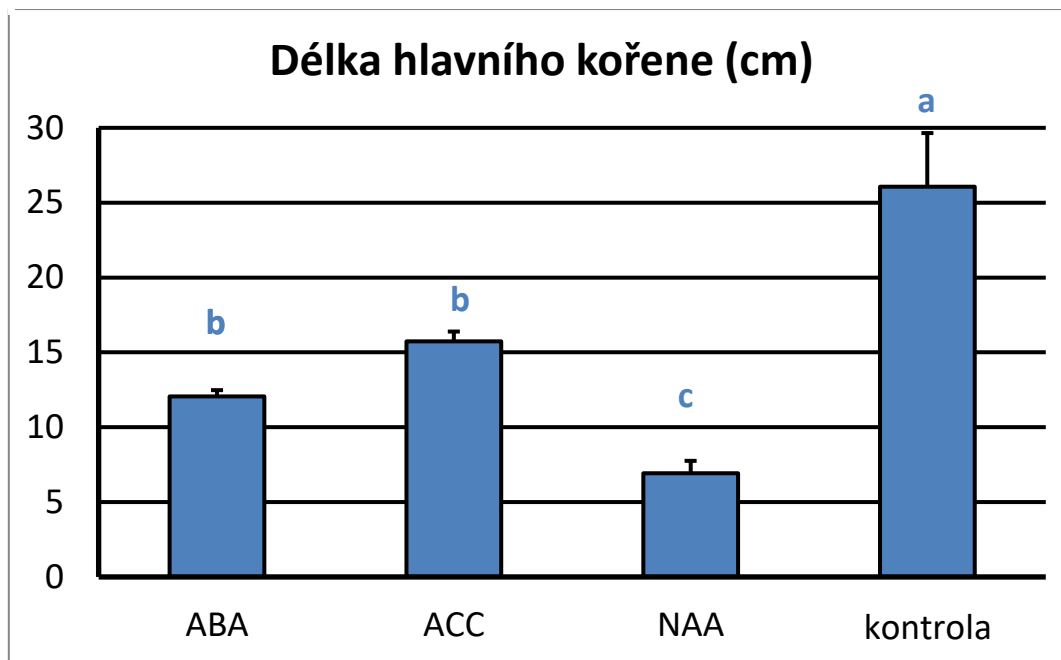
I v případě toho experimentu bylo z řezů kořenů kukuřice (*Zea mays* L.) jasně patrné, že nelze dokázat souvislost mezi lokalizací tvorby CP a oblastí, kde byl kořen ve styku s médiem bez dusíku, nebo ve styku s médiem kontrolním. Postup diferenciaci exodermis odpovídal situaci dokumentované na obr. 4.7 (viz předchozí experiment). Diferenciaci CP na těchto řezech, vzhledem k obvodu exodermis vykazuje nespojité oblasti, jejichž tvorba zřejmě nezávisela na obsahu minerálních živin v agarových plotnách, ale na působení vzduchu mezi agarovými plotnami a následném vysychání pletiv.

4.3 Analýza vlivu fytohormonů na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté

4.3.1 Experiment 3.

4.3.1.1 Morfologická analýza kořenů

Byly naměřeny délky hlavních kořenů rostoucích pod vlivem přidávaných fytohormonů. Z grafu 26. je patrný signifikantní rozdíl ABA a ACC od NAA. Kořeny s přidávanými fytohormony rostly výrazně pomaleji oproti kontrole.

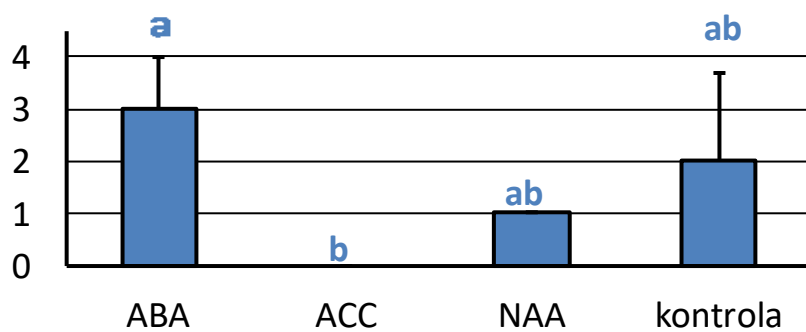


Graf 26. Délka hlavních kořenů rostlin pěstovaných v mediích s obsahem fytohormonů. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p < 0,05$, $n = 3$). Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.

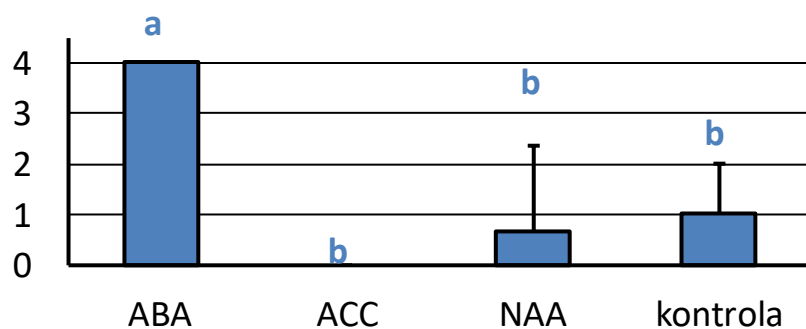
4.3.1.2 Anatomická analýza kořenů

Kořeny rostoucí v mediích s přidávkou fytohormonů vykazovaly rozdíly v nástupu diferenciaci exodermis i endodermis. V pozici $1/6$ nebyly diferencovány CP ani SL, proto tyto výsledky nebyly zaneseny do grafů. V $1/2$ kořene byly již poměrně silně diferencované apoplastické bariéry hlavně v exodermis u kořenů rostoucích s přidávkou ABA oproti kontrole. Naopak přidáním ACC se diferenciaci bariér oddálila a diferencované CP a SL se začaly objevovat až ve $3/4$ kořene. NAA na kořeny působilo podobně jako ACC, ne však s tak silným efektem (Grafy 28-33.). Výsledky diferenciaci exodermis v $1/2$, kdy jsou rozdíly nejvíce patrné, jsou vidět na obrázku 4.8.

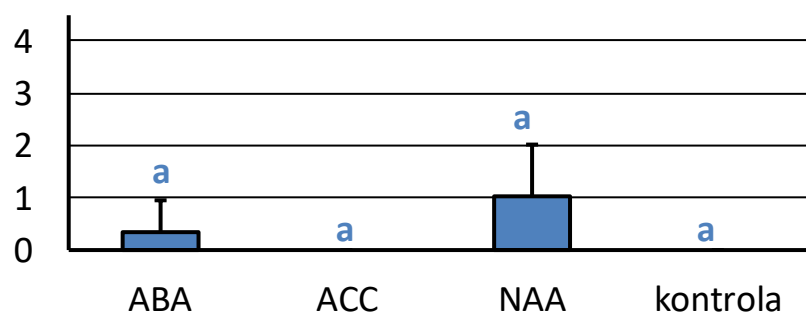
Četnost exodermálních CP v 1/2 kořene

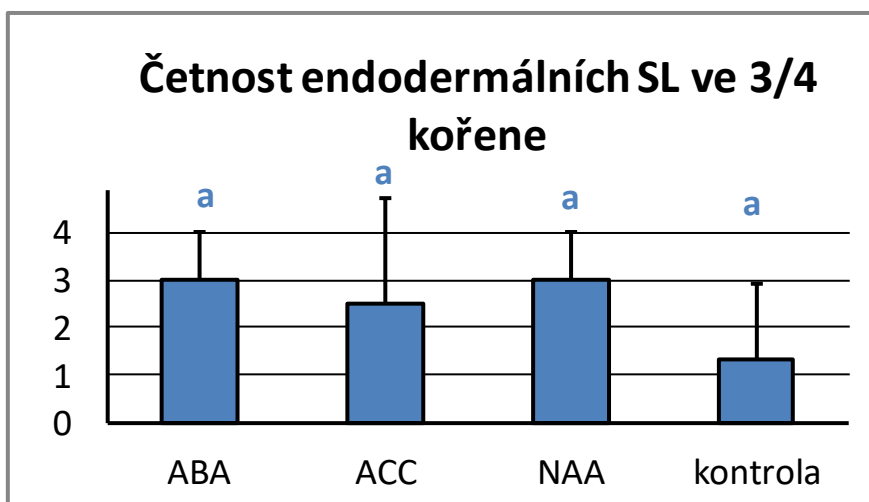
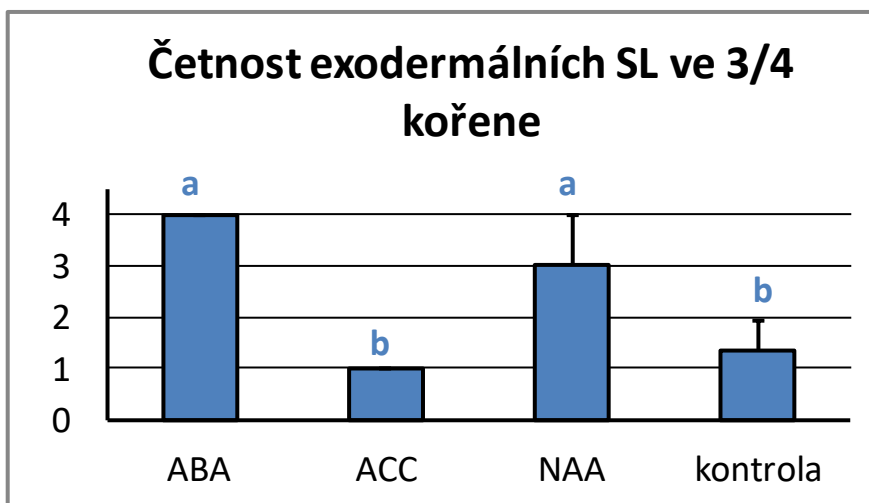
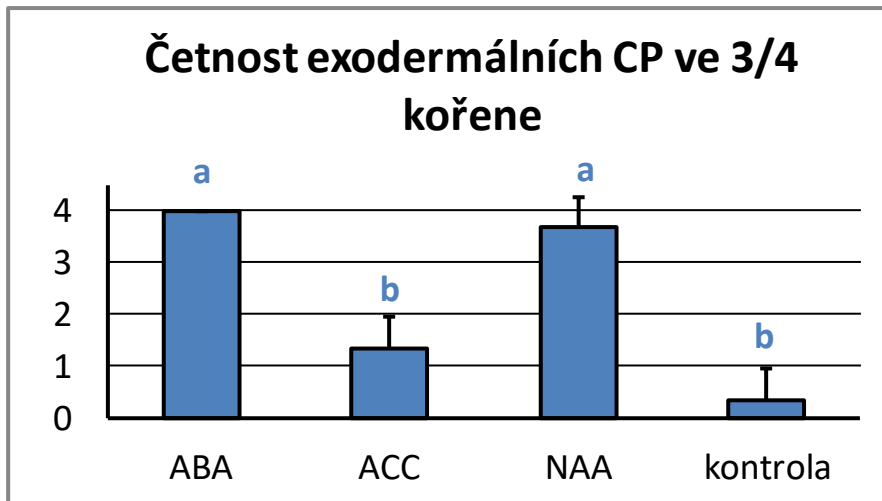


Četnost exodermálních SL v 1/2 kořene

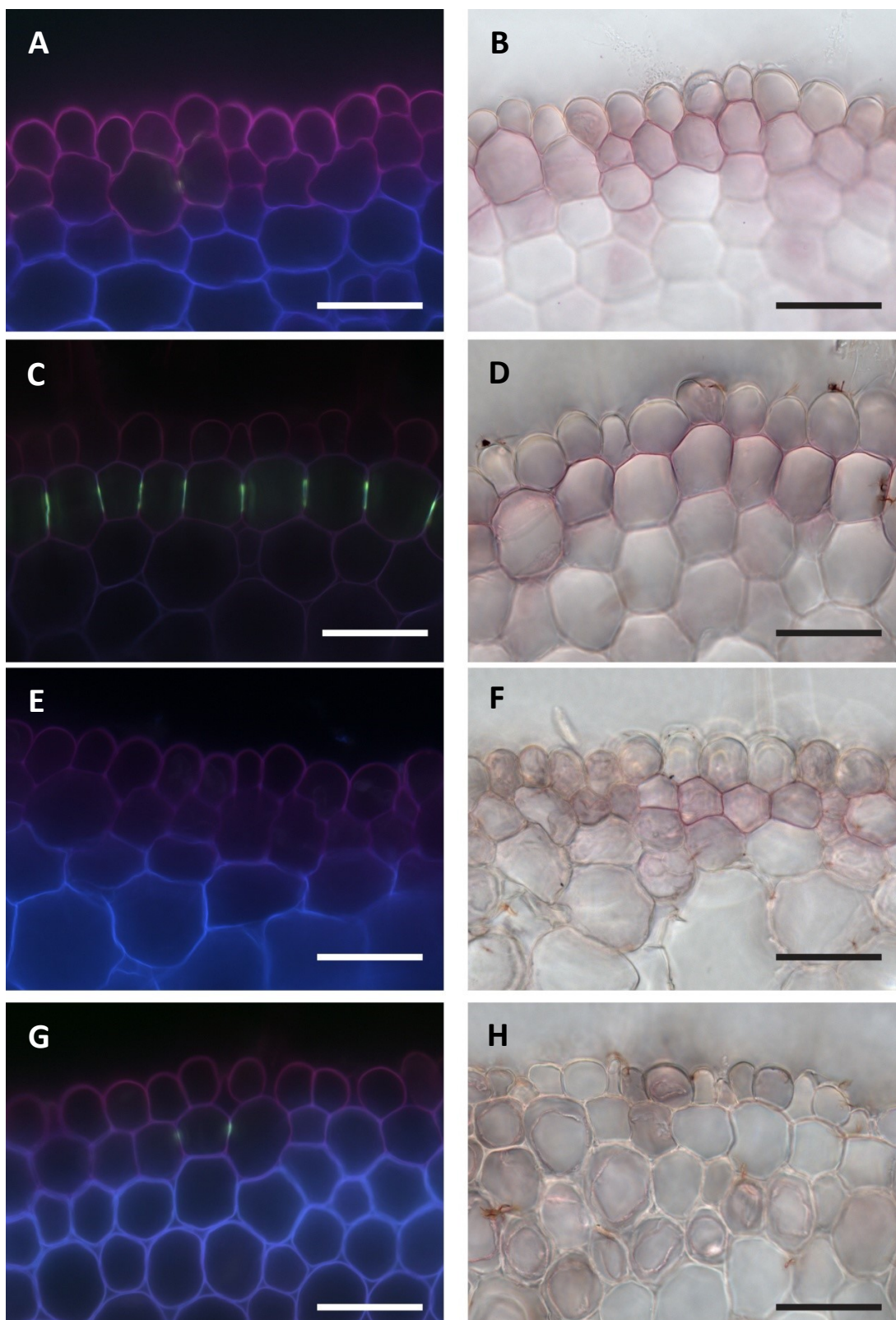


Četnost endodermálních SL v 1/2 kořene





Grafy 27- 32. Průměrné četnosti (kategorie 0-4 dle Tab. 3.2) diferencovaných apoplastických bariér hlavních kořenů z médií s fytohormony. Hodnoceno $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ délky od kořenové špičky. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami. (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p < 0,05$, $n = 3$.) Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.

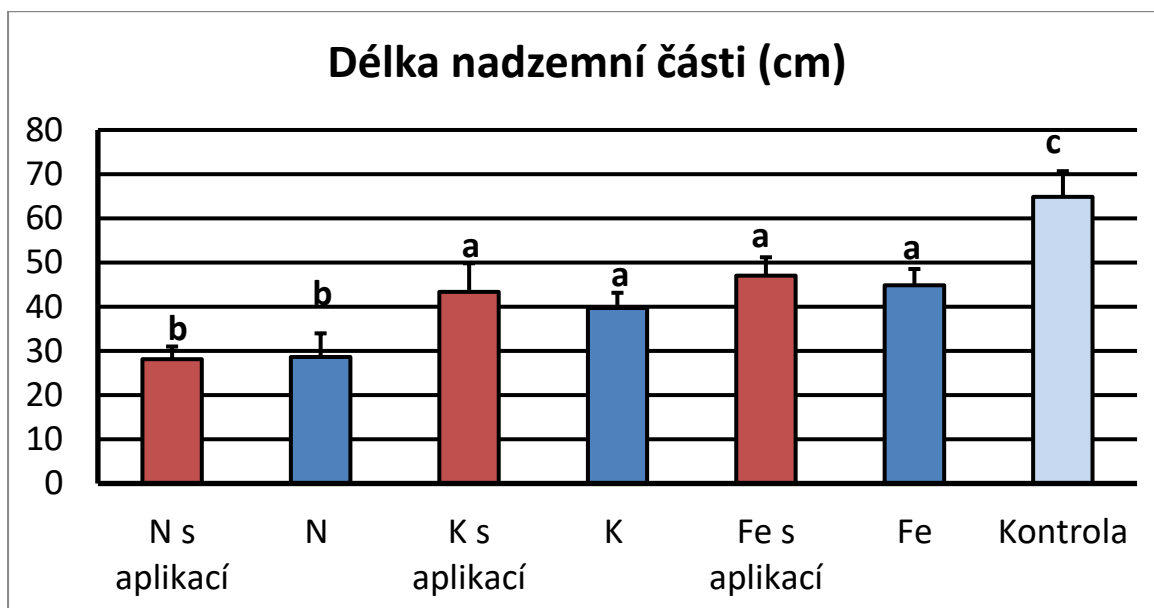


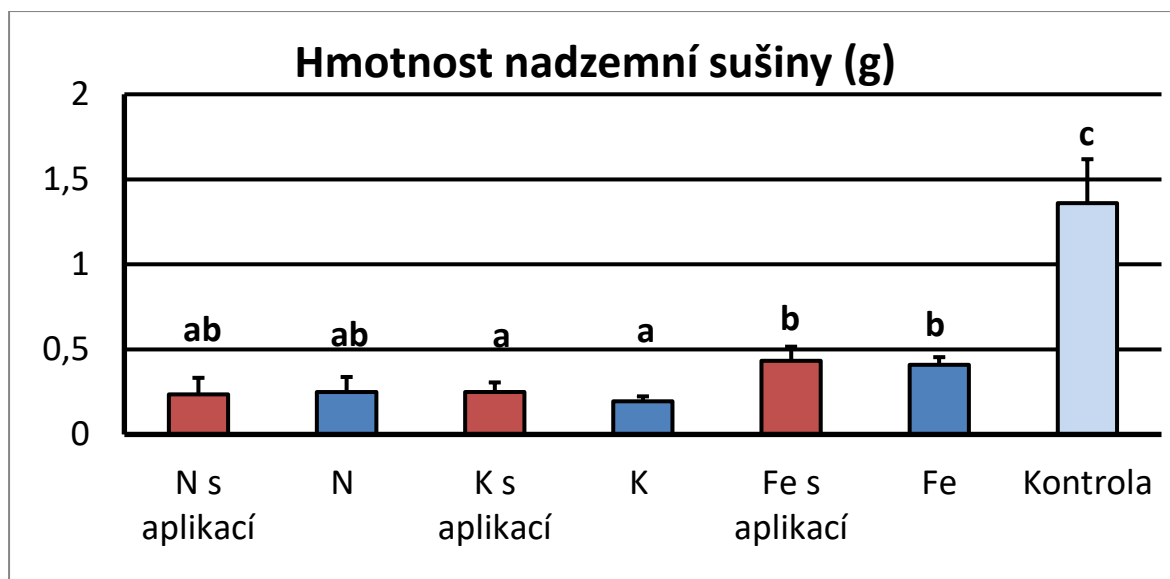
Obr. 4.8 Diferenciace exodermis. Řezy v $\frac{1}{2}$ hlavního kořene barvené (vlevo A,C,E,G) berberinem genciánovou violetí pro zvýraznění CP, (vpravo B,D,F,H) sudanem pro zvýraznění SL. (A,B) kontrola, (C,D) ABA se silně vyvinutou exodermis, (E,F) ACC s nediferencovanou exodermis, (G,H) NAA s velmi málo diferencovanou exodermis (měřítko= 50um).

4.4 Analýza vlivu nedostatku jednotlivých živin na diferenciaci exodermis v hlavním kořeni kukuřice seté s dodáním živiny na list

V rámci tohoto experimentu byla snaha testovat vliv přísunu chybějící živiny přes list. Byly vybrány tři varianty deficiencie. Deficience dusíku, která v experimentu 1.1 a 1.2 způsobila výrazně zrychlení diferenciaci exodermis a varianty Fe a K deficientní, které měly naopak diferenciaci exodermis opožděnou. V případě Fe lze předpokládat výrazně nižší efektivitu translokace z listů do kořenů oproti K.

U rostlin byla nejprve provedena růstová analýza nadzemních částí rostlin. Z grafů je patrné, že se varianta s přidávanou živinou na list signifikantně neliší od varianty bez přídavku živin (Graf 33, 34). Z toho lze usoudit, že aplikace živiny na list nebyla dostatečná pro změnu růstových parametrů. V tomto experimentu proto neproběhla detailnější analýza diferenciaci apoplastických bariér.





Grafy 33- 34. Délky a hmotnost sušiny nadzemní části rostlin pěstovaných v deficientních mediích s živinami aplikovanými na list (červené sloupce) a rostlin rostoucích v deficientních mediích bez další aplikace (modré sloupce). Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, $p < 0,05$, $n = 6$). Chybové úsečky v grafech ukazují standardní chybu průměru.

5 Diskuze

Tato diplomová práce měla za cíl objasnit vliv deficiencie živin na diferenciaci apoplastických bariér a především exodermis, která zatím není v tomto ohledu tak dobře popsána jako endodermis. V řadě prací bylo popsáno, že apoplastické bariéry vykazují výraznou plasticitu vývoje v odpovědi na řadu vnějších faktorů. Co se týče plasticity diferenciaci je významnější exodermis, která na podmínky prostředí reaguje rychleji než endodermální vrstva (Hose et al. 2001). Ale různí autoři v řadě nezávislých studií dokázali, že i endodermis může být plastická ve svém vývoji a rozsah i četnost apoplastických bariér je závislá na vnějších podmínkách a na druhu rostliny rostoucích v různých prostředích (Enstone et al. 2003, Lux et al. 2010, Karahara et al. 2004, Colmer et al. 1998). Stresové faktory jako hypoxie, sucho, zasolení či toxicita vedou k rychlejší diferenciaci apoplastických bariér (Peterson 1992, Meyer et al. 2011a, Karahara et al. 2004, Reinhardt and Rost 1995). Diferenciací exodermis rostlina získává lepší obranu proti přijímání nežádoucích látek, ale i proti unikání potřebných látek ven z kořene.

Nedostatek minerálních živin je dalším významným stresovým faktorem, který na rostliny v přírodě často působí. Na rozdíl od stresových faktorů zmíněných výše je

však jeho vliv na postup diferenciacie exodermis podstatně méně prozkoumán. Navíc je otázka, zda bude efekt podobný. Rychlejší uzavření apoplastické dráhy transportu v místě vnější části primární kůry při suchu, salinitě, nebo v přítomnosti toxických látek je zjevnou výhodou, umožňující minimalizovat ztráty vody nebo vstup nežádoucích látek do prostoru primární kůry. Podobné omezení transportu při nedostatku živin však výhodou být nemusí, protože rychlejší diferenciacie exodermis zabrání zapojení buněk vnitřní části primární kůry do příjmu živin. Několik málo dosavadních prací, které se touto otázkou v souvislosti s diferenciací exodermis zabývaly, navíc přináší rozdílné výsledky (Čížková-Končalová and Bauer 1993, Schreiber et al. 2005, Schraut et al. 2005, Pozuelo et al. 1984).

Stěžejním článkem, který se zabývá touto problematikou u endodermis je článek Barberon a spoluautorů (Barberon et al. 2016). Zde autoři popisují schopnost rostliny reagovat na změny dostupnosti živin změnou v rozsahu diferenciacie endodermis, která je zřejmě zprostředkována některými fytohormony, především kyselinou abscisovou a etylénem. Některé z jejich výsledků se shodují s našimi experimenty, což bude dále rozebráno podrobněji.

5.1 Vliv deficiencie různých živin na postup diferenciacie exodermis a endodermis

Nejdůležitějšími makroprvky pro růst a vývoj rostlin jsou N, P, K. Zároveň jsou tyto prvky nejhojněji aplikované v hnojivech pro udržení vysokého výnosu zemědělských plodin (FAO 2017). Pro rostliny jsou důležité i další makroprvky, mikroprvky a prvky benefiční. Rostliny pro jejich získání a udržení vyvinuly mnoho strategií, které zahrnují např. změny architektury kořenového systému, aktivaci vysokoafinitních transportérů živin, chemické modifikace rhizosféry, či spolupráce s mikroorganismy (Marschner 1961). Jednou z těchto strategií je zřejmě i modifikace vývoje apoplastických bariér, což detailně ukazuje recentní práce věnovaná endodermální vrstvě (Barberon et al. 2016), ale i dřívější práce zahrnující i exodermální vrstvu (Schreiber et al. 2005) či práce zaměřené na celkovou vodivost kořenů (Schraut et al. 2005).

Také výsledky experimentů v této diplomové práci, věnujících se deficienci, ukazují na velmi vysokou plasticitu vývoje exodermis i endodermis pod vlivem deficiencie různých minerálních živin. Sledovali jsme vliv deficiencí N, P, K, Mg, Fe a Ca. V kompletním živném roztoku vždy jeden ze zmíněných prvků chyběl. Pro výzkum jsme

zde a i ve všech ostatních experimentech používali kukuřici (*Zea mays* L.) jako modelovou rostlinu tvořící exodermis v kořeni. Reakce kořenů na deficienci se výrazně lišila podle toho, který prvek chyběl. Endodermis se diferencovala blíže za kořenovou špičkou u deficiencí N a P. Naopak u K a Fe deficiencie se diferencovala později (dále za špičkou) v porovnání s kontrolou. Podobně tomu bylo i u exodermis. Naše výsledky s deficiencí Fe jsou v souladu s prací na endodermis u *Arabidopsis* (Barberon et al. 2016), kdy deficiencie Fe a Zn vedla ke zpoždění suberinizace v endodermis kořene. Naopak v podmínkách deficientních na K a S, pozorovali u *Arabidopsis* zvýšenou syntézu suberinu, což je přesně opačný efekt, než byl u kořenů kukuřice (*Zea mays* L.) pozorován v této diplomové práci. Naše výsledky se nicméně shodují s dřívější prací na kukuřici, kdy se podobně za nedostatku K CP v exodermis kukuřice (*Zea mays* L.) nediferencovaly (Schraut et al. 2005). Podle (Barberon et al. 2016) je zvýšená suberinizace adaptivní odpovědí na nedostatek K a pomáhá rostlinám při udržování draselné homeostázy v deficientních podmínkách, což se v našem případě nepotvrdilo. Rozdílný výsledek nemůže být v tomto případě vysvětlen odlišnou reakcí endodermální a exodermální vrstvy, protože se v kořenech kukuřice při deficienci K utvářela později endodermis i exodermis. Může jít o mezidruhové rozdíly, protože práce Barberon a spoluautorů (2016) byla prováděna na huseníčku (*Arabidopsis thaliana*).

Dále jsme pozorovali, že nedostatek N a P vyvolal výrazné zrychlení maturace exodermis i endodermis, tedy silné posílení tvorby apoplastických bariér, což se částečně shoduje s prací na ostřici kultivované v různých trofických podmínkách. V této práci byly rostliny tří druhů ostřice (*Carex*) pěstovány v kalu z čistírny odpadních vod. Toto prostředí, velmi bohaté na N a P, zřejmě způsobilo rychlý růst kořenů a došlo ke zpoždění maturace pletiv kořene, což se projevilo i pozdější diferenciací exodermis v těchto podmínkách. Naopak v oligotrofních variantě s nízkou dostupností N a P byla exodermis v kořenech ostřic výrazně vyvinuta (Čížková-Končalová and Bauer 1993). Autorka tyto výsledky dává do souvislosti s častým poškozením kořenů mokřadních rostlin rostoucích v litorálu vodních těles zasažených eutrofizací, kdy mohou být nedostatečně diferencovaná pletiva rychle rostoucích kořenů snadněji poškozena působením fyto toxických látek z eutrofizovaného mokřadního sedimentu. Posílení lignifikace CP spolu se snížením hydraulické vodivosti kořenů u kukuřice v podmínkách deficiencie N pozoroval také Schraut a spoluautoři (2005). Opačný výsledek byl nicméně zaznamenán u skočce (*Ricinus communis* L.), kdy došlo při deficienci N naopak ke zpoždění maturace

(Schreiber et al. 2005). Zde autoři naopak uvažují výhodu pozdější maturace exodermis v lepší možnosti difuze minerálních živin z rhizosféry do prostoru primární kůry. Dosavadní výsledky tedy naznačují, že mohou existovat mezidruhové rozdíly, roli ale mohou hrát i rozdíly v experimentálním uspořádání a způsobu vzorkování kořenů.

5.1.1 Existuje korelace mezi biometrickými charakteristikami kořene a postupem diferenciací exodermis a endodermis?

Jak již bylo zmíněno výše, v práci na kořenech ostřice (*Carex*) došlo při nadbytku živin ke zpoždění tvorby bariér, což se projevilo rychlejšímu růstu kořenů a následné diferenciaci pletiv tedy i exodermis dále za kořenovou špičkou. Vzhledem k tomuto předpokladu negativní korelace mezi rychlostí růstu a rychlostí diferenciací apoplastických bariér (Čížková-Končalová and Bauer 1993), byly v rámci diplomové práce kromě histochemické detekce apoplastických bariér měřeny i základní biometrické charakteristiky analyzovaných kořenů (délka, větvení). Tato měření ukázala, že hlavní kořeny z různých deficiencí vykazovaly různou celkovou délku hlavní osy i různou distribuci postranních kořenů (různou délku nevětvené apikální části hlavní osy kořene). Výrazně kratší hlavní kořeny byly pozorovány u rostlin v deficienci P, Fe a K v porovnání s kontrolní variantou a N deficientní variantou (především v experimentu 1.1). U deficiencie fosforu jde nejspíš o případ systémové odpovědi, kdy dochází ke zvýšenému větvení kořene na úkor délky hlavní osy kořene (Perez-Torres et al. 2008, Lopez-Bucio et al. 2002). U kukuřice (*Zea mays* L.) bylo dříve zdokumentováno, že tvorba postranních kořenů je důležitá pro efektivní získávání fosforu z media (Zhu and Lynch 2004). Při deficienci dusíku je na systémové úrovni regulován růst hlavního i postranních kořenů a jejich větvení, většinou dochází spíše k prodlužování postranních kořenů, ale elongace hlavní osy kořene zůstává zachována (Giehl and von Wirén 2014).

V našem experimentu 1.1 byly kratší kořeny z P deficiencie a kořeny rostoucí v N deficienci byly délkou srovnatelné s kontrolou. Nicméně při opakování experimentu (exp. 1.2) byly kořeny s N a P deficiencie dokonce signifikantně kratší než kontrola. Z výše popsaných výsledků je tedy patrné, že se délka kořenů mezi deficiencí P a N lišila, a přesto anatomická analýza ukázala velmi rychlý nástup diferenciací v exodermis i v endodermis v obou těchto variantách. Nelze tedy potvrdit obecně platnou negativní korelaci mezi celkovou délkou kořene a rychlostí diferenciací apoplastických bariér.

Tento závěr podporuje také měření délek nevětvených částí kořene. Tento parametr je v některých pracích dáván do souvislosti s rychlostí růstu kořene respektive aktivitou jeho apikálního meristému. Pokud vyhasíná aktivita apikálního meristému, je možno pozorovat diferencované struktury (vodivá pletiva, kořenové vlásky, postranní kořeny) blíže za kořenovou špičkou. Existuje tedy negativní korelace mezi rychlostí růstu a vzdáleností, kde jsou diferencované struktury přítomny (Lopez-Bucio et al. 2002, Perez-Torres et al. 2008).

V experimentech v této diplomové práci se délky nevětvených částí mezi variantami od sebe příliš nelišily, signifikantně kratší byly pouze u Fe a K deficientní varianty. V Fe deficientní variantě byly postranní kořeny většinou přítomné již ve velmi krátké vzdálenosti za kořenovou špičkou, i když celková délka hlavního kořene byla srovnatelná (v experimentu 1.2 dokonce větší) s kořenem v N deficienci. Tento výsledek je v souladu s dřívějšími pozorováními větvení kořenů v odpovědi na nedostatek železa, např. u jetele (*Trifolium pretense*) nebo rajčete (*Solanum lycopersicum*) (Jin et al. 2008, Jin et al. 2011). Podobně u deficiencie draslíku byla pozorována stimulace růstu postranních kořenů na úkor hlavní osy u některých ekotypů *Arabidopsis* (Kellermeier et al. 2013). Diferenciace exodermis byla nicméně u obou těchto variant zpožděná ve srovnání s kontrolní a především N a P deficientní variantou.

Závěrem je tedy možno shrnout, že experimenty v této diplomové práci nepotvrzují obecnou negativní korelaci mezi rychlostí růstu a rychlostí diferenciace exodermis. Nejrychlejší postup diferenciace exodermis byl patrný u variant deficientních na dusík a fosfor. V těchto variantách četnost CP nekorelovala s délkou kořenů, obě varianty měly stejnou četnost CP, i když kořen rostoucí v N deficienci byl signifikantně delší než u P deficiencie. Z toho vyplývá, že stupeň diferenciace bariér nekoreloval s délkou kořene, protože kořeny v N deficientní variantě byly mnohem delší než kořeny ve variantě deficientní na P.

5.2 Vliv lokálního nedostatku živin

V experimentech s hydroponicky pěstovanými rostlinami byl patrný výrazný efekt deficiencie N a P na postup diferenciace a proto jsme se rozhodli otestovat, zda je možno pozorovat i lokalizovanou odpověď. Výsledky zmíněné v review o působení kadmia ukázaly, že diferenciace apoplastických bariér je ovlivnitelná i lokálně (Lux et al. 2010).

Pro experiment se „sendvičovou“ metodou jsme se inspirovali prací o lokálním působení osmotického stresu indukovaného přítomností mannitolu na tvorbu aerenchymu (Karahara et al. 2012). Naše první experimenty tohoto typu naznačovaly jisté lokální ovlivnění diferenciace exodermální vrstvy, ale několikanásobným opakováním experimentu a přidáním kontrolní varianty K/K, kdy obě agarové desky množstvím dusíku nelišily a množství živin odpovídalo kontrolní variantě dříve provedených hydroponických kultivací, se lokalizovaný efekt deficiencie dusíku nepotvrdil. V případě toho experimentu se nepodařilo dokázat souvislost mezi lokalizací tvorby exodermálních CP a oblastí, kde byl kořen ve styku s médiem bez dusíku, nebo ve styku s médiem kontrolním. Diferenciace CP v exodermis vykazovala nespojitě oblasti, jejichž tvorba zřejmě nezávisela na obsahu minerálních živin v agarových plotnách, ale na působení vzduchu mezi agarovými plotnami a následném vysychání pletiv. Z těchto výsledků lze tedy uzavřít, že lokalizovaná přítomnost dusíku jen v části rhizosféry nevyvolává lokalizovanou odpověď kořene na úrovni diferenciace exodermis, vzduch měl efekt na diferenciaci exodermis výrazně silnější. Působení vzduchu nebylo v experimentu (Karahara et al. 2012) pozorováno, nicméně je dobře dokumentováno právě u kukuřice při pěstování rostlin, jejichž kořeny jsou v kontaktu pouze s jednou agarovou deskou (Líška et al. 2016). Ve stejné práci měl vliv toxického kadmia velmi silný lokalizovaný efekt a posílil diferenciaci exodermis pouze v části kořene, která byla ve styku s agarem obohaceným o kadmium (Líška et al. 2016). N deficiencie tedy zřejmě nemá, na rozdíl od kadmia, osmotického stresu nebo vystavení kořene přímému kontaktu s atmosférou, tak silný vliv, aby mohl být pozorován v této experimentální sendvičové metodě.

5.3 Vliv nedostatku jednotlivých živin s dodáním živiny na list

Tento experiment měl odpovědět na otázku, zda byl stupeň diferenciace apoplastických bariér pozorovaný v experimentu 1 a 2 důsledkem spíše místní odpovědi kořenů na vlastnosti rhizosféry, nebo šlo o systémovou reakci způsobenou nedostatkem daného prvku pro správné fungování rostliny (včetně enzymatických reakcí nezbytných např. pro vznik CP a SL). Proto byly vybrané živiny aplikovány na list, tedy dodány rostlině jinou formou než přes kořenový systém. Analýza na nadzemních částech rostlin nicméně ukázala, že se nadzemní biomasa varianty s přidávanou živinou na list signifikantně neliší od varianty bez přídatku živin. Z důvodu, že se varianty rostlin od sebe nelišily, nebyla prováděna další analýza na anatomii ani morfologii kořenů, protože lze předpokládat minimální efekt. Tento experiment bude nutno v budoucnu zopakovat v optimalizovaném

uspořádání, např. využít dělené kořenové kultury, kdy bude část kořenového systému umístěna v roztoku deficientním a druhá část v roztoku s přídáním živin (Liu et al. 2008).

5.4 Vliv fytohormonů na rychlost diferenciaci exodermis

Vzhledem k tomu, že bylo recentně popsáno zapojení ABA a etylénu v regulaci suberinizace endodermis u *Arabidopsis* v odpovědi na deficienci živin (Barberon et al. 2016), byl v rámci diplomové práce proveden experiment testující vliv externí aplikace ABA, ACC a také NAA na vývoj exodermis. Opět byla použita kukuřice (*Zea mays* L.) jako modelová rostlina. V tomto případě bylo tedy na působení fytohormonů nahlíženo z hlediska vlivu na růst morfologii kořenů a jejich anatomickou stavbu (diferenciaci exodermis, endodermis) bez působení deficiencie živin.

Auxin, jakožto nejdůležitější fytohormon, má stimulační, nebo inhibiční účinky na růst, podle množství a místa působení v rostlině. Dnes se pro experimentální účely spíše než přírodní auxin IAA, který je fotolabilní, používá syntetický auxin např. NAA, proto byl využit i v rámci tohoto experimentu. Auxin je zapojen do systémové reakce kořenového systému v odpovědi na deficienci P i N a reguluje růst hlavního i postranních kořenů a větvení postranních kořenů podle intenzity deficiencie dusíku, které byla rostlina vystavena (Giehl and von Wirén 2014). Podobně působí i při nedostatku fosforu (Desnos 2008, López-Bucio et al. 2003, Pérez-Torres et al. 2008). Vzhledem k tomu, že kořeny kukuřice reagovaly v experimentu 1.1 i 1.2 na nedostatek N i P velmi rychlou diferenciací exodermis i endodermis, byl kromě ABA a etylénu také pro auxin testován jeho vliv na postup diferenciaci apoplastických bariér.

V našem případě působil auxin v plnohodnotném médiu bez deficiencí na délku hlavního kořene stejně jako při systémové odpovědi na nedostatek N a P, kdy dochází k zastavení růstu hlavního kořene. Z analýzy měření délky hlavních kořenů byl patrný signifikantní rozdíl ABA a ACC od varianty NAA, která měla nejkratší kořeny. Všechny kořeny s přídáním fytohormony nicméně rostly výrazně pomaleji oproti kontrole. NAA mělo inhibiční vliv také na diferenciaci exodermis a endodermis, což bylo patrné v mladších částech kořene, až ve $\frac{3}{4}$ délky kořene od špičky se rozsah diferenciaci vyrovnal kontrole. Na morfologii kořene silně působí také ethylen. Ethylen má výrazný stimulační vliv na tvorbu aerenchymu v kořenech (Gunawardena et al. 2001, Drew et al. 1979, Justin and Armstrong 1991). Již při nízké koncentraci podporoval ethylen prodlužování kořenů u některých druhů, ale vyšší koncentrace kořenovému růstu bránila (Abeles et al. 2012,

Smith and Robertson 1971, Jackson et al. 1985, Konings and Jackson 1979, Abeles et al. 1992). Nízká koncentrace přímého prekursoru syntézy etylenu ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina) přidaného do media v našem případě nepodporovala růst hlavního kořene, což se shoduje s dřívějšími pracemi, kdy ethylen vyvolal snížení celkové délky hlavních a vedlejších kořenů (Borch et al. 1999).

Z anatomického pohledu ACC výrazně zpomalilo tvorbu apoplastických bariér, neboť ještě v 1/2 kořene nebyly diferencované žádné exodermální CP a nebyly patrné suberinové lamely v endodermis ani exodermis. Rostliny *Arabidopsis* pod působením ACC také vykazovaly snížení celkového obsahu suberinu v endodermis (Barberon et al. 2016). Pozorování u *Arabidopsis* dokázalo, že ACC snižuje biosyntézu suberinu (o 40% ve srovnání s kontrolou), a dokonce zřejmě způsobuje aktivní degradaci již existujících SL (Barberon et al. 2016).

Fytohormon, který výrazně působí na anatomii kořene je ABA. ABA například může v podmínkách mírného sucha zvýšit hydraulickou vodivost kortikálních kořenových buněk, pro zlepšení absorpce vody (Hose et al. 2001, Wan et al. 2004). Při našem pozorování ABA výrazně urychlila diferenciaci CP a SL v exodermis oproti kontrole. Stejný efekt popisuje i (Barberon et al. 2016), kdy chemické měření suberinu po aplikaci ABA ukázalo silné zvýšení obsahu suberinu v kořenech. Působení ABA vede k ektopické depozici suberinu v mladých částech kořene a v primární kůře.

6 Závěr

Hlavním úkolem této práce byla analýza rozsahu utváření apoplastických bariér při deficienci jednotlivých živin a vlivu fytohormonů na tuto diferenciaci. Byl zmapován nejen trend v ukládání endodermální i exodermální vrstvy, o které je zatím v tomto směru jen velmi málo prací, a navíc s protichůdnými výsledky. Sledováním morfologické stavby a anatomie kořenů byla lépe popsána variabilita exodermální vrstvy, jejíž diferenciace je na rozdíl od vrstvy endodermální více ovlivněna okolními podmínkami prostředí. Mezi kořeny rostoucími v jednotlivých deficiencích byl signifikantní rozdíl v rychlosti diferenciace apoplastických bariér, kdy nejvýraznějším příkladem byly Fe a N deficiencie. V deficienci Fe a také K došlo ke zpomalení diferenciace exodermis i endodermis, naopak v deficienci N a P k výraznému urychlení. Použitím sendvičové metody jsme zjistili, že lokalizované působení deficiencie N nemělo žádný lokální efekt na tvorbu apoplastických bariér. Následně byl výzkum věnován vlivu fytohormonů na postup diferenciace endodermis a exodermis. Získané výsledky dokumentují vliv fytohormonů - auxinu, etylenu, kyseliny abscisové na vývoj struktury hlavního kořene kukuřice seté (*Zea mays* L.). V tomto experimentu vyšel nejvýraznější stimulační vliv na diferenciaci exodermis pod působením přidané ABA. Použitím sendvičové metody jsme zjistili, že lokalizované působení deficientního N nemělo žádný efekt na tvorbu apoplastických bariér. Tato zjištění otvírají zajímavé pole působnosti pro další výzkum.

Další výzkum by mohl být zaměřen na vliv a vzájemné propojení aplikovaných fytohormonů do medií deficientních na různé prvky. Podobně jako práci na endodermis u *Arabidopsis* (Barberon et al. 2016), jen s větším zaměřením na diferenciaci exodermální vrstvy. Toto pozorování by mohlo pomoci dalšímu výzkumu a šlechtění plodin odolných vůči nepříznivým podmínkám prostředí.

7 Seznam použité literatury

- ABELES F, MORGAN P AND SALTVEIT JR M. 1992. Ethylene. Plant Biology, 2nd ed, Academic Press, New York.
- ABELES FB, MORGAN PW AND SALTVEIT JR ME 2012. Ethylene in plant biology. Academic press.
- ALASSIMONE J, NASEER S AND GELDNER N. 2010. A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 5214-5219.
- ALONI R, ALONI E, LANGHANS M AND ULLRICH CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. Annals of botany 97: 883-893.
- ANGHINONI IA AND BARBER S. 1980. Phosphorus Influx and Growth Characteristics of Corn Roots as Influenced by Phosphorus Supply 1. Agronomy Journal 72: 685-688.
- ARMSTRONG J AND ARMSTRONG W. 2001. Rice and Phragmites: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. American Journal of Botany 88: 1359-1370.
- ARMSTRONG J AND ARMSTRONG W. 2005. Rice: sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe²⁺ and water uptake, and lateral root emergence. Annals of botany 96: 625-638.
- ARMSTRONG W, COUSINS D, ARMSTRONG J, TURNER D AND BECKETT P. 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with Phragmites australis. Annals of botany 86: 687-703.
- ATKINSON D. 1973. Some general effects of phosphorus deficiency on growth and development. New Phytologist 72: 101-111.
- BARBERON M, VERMEER JEM, DE BELLIS D, WANG P, NASEER S, ANDERSEN TG, HUMBEL BM, NAWRATH C, TAKANO J AND SALT DE. 2016. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. Cell 164: 447-459.
- BARNABAS AD AND PETERSON CA. 1992. Development of Casparian bands and suberin lamellae in the endodermis of onion roots. Canadian Journal of Botany 70: 2233-2237.
- BAXTER I, HOSMANI PS, RUS A, LAHNER B, BOREVITZ JO, MUTHUKUMAR B, MICKELBART MV, SCHREIBER L, FRANKE RB AND SALT DE. 2009. Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. PLoS genetics 5: e1000492.
- BENKOVA E AND BIELACH A. 2010. Lateral root organogenesis - from cell to organ. Current opinion in plant biology 13: 677-683.
- BERNARDS MA. 2002. Demystifying suberin. Canadian Journal of Botany 80: 227-240.
- BIGOT J AND BINET P. 1986. Study of exchange capacities and cationic selectivities of walls isolated from roots of Cochlearia-anglica and Phaseolus-vulgaris cultivated on diversely saline media. Canadian journal of botany 64: 955-958.
- BOERJAN W, RALPH J AND BAUCHER M. 2003. Lignin biosynthesis. Annual review of plant biology 54: 519-546.
- BORCH K, BOUMA T, LYNCH J AND BROWN K. 1999. Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. Plant, cell & environment 22: 425-431.
- BRIGGS G AND ROBERTSON R. 1957. Apparent free space. Annual Review of Plant Physiology 8: 11-30.
- BRUNDRETT MC, ENSTONE DE AND PETERSON CA. 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. Protoplasma 146: 133-142.

- BRUNDRETT MC, KENDRICK B AND PETERSON CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* 66: 111-116.
- CARPITA NC, NABORS MW, ROSS CW AND PETRETIC NL. 1979. The growth physics and water relations of red-light-induced germination in lettuce seeds. *Planta* 144: 225-233.
- CASPARY R. 1865. Bemerkung über die schutzscheide und die bildung des stammes und der wurzel. *Jahrb Wiss Bot* 23: 101–124.
- CLARKSON D, ROBARDS A, STEPHENS J AND STARK M. 1987. Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots; development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant, cell & environment* 10: 83-93.
- CLARKSON DT, CARVAJAL M, HENZLER T, WATERHOUSE RN, SMYTH AJ, COOKE DT AND STEUDLE E. 2000. Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *Journal of experimental botany* 51: 61-70.
- COLMER TD, GIBBERD MR, WIENGWEERA A AND TINH TK. 1998. The barrier to radial oxygen loss from roots of rice (*Oryza sativa* L.) is induced by growth in stagnant solution. *Journal of experimental botany* 49: 1431-1436.
- COPEL D AND MANDEL N. 2000. Effects of IBA and NAA treatments on rooting Douglas-fir stem cuttings. *New forests* 20: 249-257.
- COTTLE W AND KOLATTUKUDY P. 1982. Abscisic acid stimulation of suberization: induction of enzymes and deposition of polymeric components and associated waxes in tissue cultures of potato tuber. *Plant physiology* 70: 775-780.
- CRAM DJ AND HAMMOND GS 1969. *Organická chemie*. Academia.
- CRUZ RT, JORDAN WR AND DREW MC. 1992. Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant physiology* 99: 203-212.
- ČÍŽKOVÁ-KONČALOVÁ H AND BAUER V. 1993. Response of a wetland sedge, *Carex gracilis* Curt., to hyper-eutrophic conditions: Interactions between anaerobiosis and high nitrogen availability. *Limnol Aktuell* 5: 23-32.
- DAVIN LB AND LEWIS NG. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant physiology* 123: 453-462.
- DEGENHARDT B AND GIMMLER H. 2000. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of experimental botany* 51: 595-603.
- DESNOS T. 2008. Root branching responses to phosphate and nitrate. *Current opinion in plant biology* 11: 82-87.
- DOBLAS VG, SMAKOWSKA-LUZAN E, FUJITA S, ALASSIMONE J, BARBERON M, MADALINSKI M, BELKHADIR Y AND GELDNER N. 2017. Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science* 355: 280-284.
- DREW M, JACKSON M AND GIFFARD S. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. *Planta* 147: 83-88.
- ENSTONE DE AND PETERSON CA. 1997. Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis. *Canadian Journal of Botany* 75: 1188-1199.
- ENSTONE DE AND PETERSON CA. 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, cell & environment* 28: 444-455.
- ENSTONE DE, PETERSON CA AND MA F. 2003. Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351.
- ESAU K 1953. *Plant anatomy*. John Wiley & Sons, Inc, n. 75, New York, 407 p.
- FAIYUE B, AL-AZZAWI MJ AND FLOWERS TJ. 2010. The role of lateral roots in bypass flow in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, cell & environment* 33: 702-716.

- FAO. 2017. World fertilizer trends and outlook to 2020.
- FÄSSLER E, EVANGELOU MW, ROBINSON BH AND SCHULIN R. 2010. Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS). *Chemosphere* 80: 901-907.
- FOO E, YONEYAMA K, HUGILL CJ, QUITTENDEN LJ AND REID JB. 2013. Strigolactones and the Regulation of Pea Symbioses in Response to Nitrate and Phosphate Deficiency. *Molecular plant* 6: 76-87.
- FREUNDL E, STEUDLE E AND HARTUNG W. 1998. Water uptake by roots of maize and sunflower affects the radial transport of abscisic acid and its concentration in the xylem. *Planta* 207: 8-19.
- FREUNDL E, STEUDLE E AND HARTUNG W. 2000. Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta* 210: 222-231.
- FRIML J. 2003. Auxin transport—shaping the plant. *Current opinion in plant biology* 6: 7-12.
- GELDNER N. 2013. The endodermis. *Annual review of plant biology* 64: 531-558.
- GELDNER N, ANDERS N, WOLTERS H, KEICHER J, KORNBERGER W, MULLER P, DELBARRE A, UEDA T, NAKANO A AND JÜRGENS G. 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-230.
- GIEHL RFH AND VON WIRÉN N. 2014. Root Nutrient Foraging. *Plant physiology* 166: 509-517.
- GOGARTEN JP. 1988. Physical properties of the cell wall of photoautotrophic suspension cells from *Chenopodium rubrum* L. *Planta* 174: 333-339.
- GUNAWARDENA AH, PEARCE DM, JACKSON MB, HAWES CR AND EVANS DE. 2001. Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205-214.
- HABERLANDT 1884. *Physiologische Pflanzenanatomie*. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- HARTUNG W, SCHRAUT D AND JIANG F. 2005. Physiology of abscisic acid (ABA) in roots under stress—a review of the relationship between root ABA and radial water and ABA flows. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 1253-1259.
- HATFIELD R AND FUKUSHIMA RS. 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop science* 45: 832-839.
- HAYNES R. 1980. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants. *The Botanical Review* 46: 75-99.
- HOAGLAND DR AND ARNON DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular California agricultural experiment station* 347.
- HOSE E, CLARKSON D, STEUDLE E, SCHREIBER L AND HARTUNG W. 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of experimental botany* 52: 2245-2264.
- HOSE E, STEUDLE E AND HARTUNG W. 2000. Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta* 211: 874-882.
- HOSMANI PS, KAMIYA T, DANKU J, NASEER S, GELDNER N, GUERINOT ML AND SALT DE. 2013. Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 14498-14503.
- HUSAKOVA. 2008. Root structure of maize; effect of phytohormones. Master thesis.
- CHAFFEY N, CHOLEWA E, REGAN S AND SUNDBERG B. 2002. Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiologia plantarum* 114: 594-600.
- CHESSON A, GARDNER PT AND WOOD TJ. 1997. Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75: 289-295.
- CHOLEWA E AND PETERSON CA. 2004. Evidence for symplastic involvement in the radial movement of calcium in onion roots. *Plant physiology* 134: 1793-1802.

- JACKSON M, FENNING T, DREW M AND SAKER L. 1985. Stimulation of ethylene production and gas-space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. by small partial pressures of oxygen. *Planta* 165: 486-492.
- JIN CW, DU ST, SHAMSI IH, LUO BF AND LIN XY. 2011. NO synthase-generated NO acts downstream of auxin in regulating Fe-deficiency-induced root branching that enhances Fe-deficiency tolerance in tomato plants. *Journal of experimental botany* 62: 3875-3884.
- JIN Z, YANG Y, CHOI J, SHINDE P, YOON S, HAHN T-W, LIM H, PARK Y, HAHM K-S AND JOO J. 2008. Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as a novel antimicrobial agent in weanling pigs. *Journal of animal science* 86: 1562-1572.
- JUNG J-Y, SHIN R AND SCHACHTMAN DP. 2009. Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 21: 607-621.
- JUSTIN S AND ARMSTRONG W. 1991. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 118: 49-62.
- KARAHARA I, IKEDA A, KONDO T AND UETAKE Y. 2004. Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219: 41-47.
- KARAHARA I, UMEMURA K, SOGA Y, AKAI Y, BANDO T, ITO Y, TAMAOKI D, UESUGI K, ABE J AND YAMAUCHI D. 2012. Demonstration of osmotically dependent promotion of aerenchyma formation at different levels in the primary roots of rice using a 'sandwich' method and X-ray computed tomography. *Annals of botany* 110: 503-509.
- KELLERMEIER F, CHARDON F AND AMTMANN A. 2013. Natural variation of *Arabidopsis* root architecture reveals complementing adaptive strategies to potassium starvation. *Plant physiology* 161: 1421-1432.
- KIEBER JJ AND SCHALLER GE. 2014. Cytokinins. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 12.
- KOLTAI H. 2011. Strigolactones are regulators of root development. *New Phytologist* 190: 545-549.
- KONINGS H AND JACKSON MB. 1979. A relationship between rates of ethylene production by roots and the promoting or inhibiting effects of exogenous ethylene and water on root elongation. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 92: 385-397.
- KOROBOVA A, VYSOTSKAYA L, VASINSKAYA A, KULUEV B, VESELOV SY AND KUDOYAROVA G. 2016. Dependence of root biomass accumulation on the content and metabolism of cytokinins in ethylene-insensitive plants. *Russian journal of plant physiology* 63: 597-603.
- KOSMA DK, MURMU J, RAZEQ FM, SANTOS P, BOURGAULT R, MOLINA I AND ROWLAND O. 2014. At MYB 41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types. *The Plant Journal* 80: 216-229.
- KRAMER PJ AND BOYER JS 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic press.
- KRISHNAMURTHY A AND VISSING-JORGENSEN A 2011. The effects of quantitative easing on interest rates: channels and implications for policy. National Bureau of Economic Research.
- KRISHNAMURTHY P, RANATHUNGE K, FRANKE R, PRAKASH H, SCHREIBER L AND MATHEW M. 2009. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 230: 119-134.
- KRISHNAMURTHY P, RANATHUNGE K, NAYAK S, SCHREIBER L AND MATHEW M. 2011. Root apoplastic barriers block Na⁺ transport to shoots in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany* 62: 4215-4228.
- KROEMER K. 1903. Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibliotheca Botanica* 59: 151.
- KROUK G, LACOMBE B, BIELACH A, PERRINE-WALKER F, MALINSKA K, MOUNIER E, HOYEROVA K, TILLARD P, LEON S AND LJUNG K. 2010. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell* 18: 927-937.

- LANDSBERG E-C. 1984. Regulation of iron-stress-response by whole-plant activity. *Journal of Plant Nutrition* 7: 609-621.
- LAŠTŮVKA Z AND MINÁŘ J 1967. Metoda vodních kultur vyšších rostlin. Univerzita JE Purkyně.
- LEE Y, RUBIO MC, ALASSIMONE J AND GELDNER N. 2013. A Mechanism for Localized Lignin Deposition in the Endodermis. *Cell* 153: 402-412.
- LI B, KAMIYA T, KALMBACH L, YAMAGAMI M, YAMAGUCHI K, SHIGENOBU S, SAWA S, DANKU JM, SALT DE AND GELDNER N. 2017. Role of LOTR1 in nutrient transport through organization of spatial distribution of root endodermal barriers. *Current Biology* 27: 758-765.
- LÍŠKA D, MARTINKA M, KOHANOVA J AND LUX A. 2016. Asymmetrical development of root endodermis and exodermis in reaction to abiotic stresses. *Annals of botany* 118: 667-674.
- LIU J, HAN L, CHEN F, BAO J, ZHANG F AND MI G. 2008. Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *Plant science* 175: 272-282.
- LÓPEZ-BUCIO J, CRUZ-RAMÍREZ A AND HERRERA-ESTRELLA L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology* 6: 280-287.
- LOPEZ-BUCIO J, HERNANDEZ-ABREU E, SANCHEZ-CALDERON L, NIETO-JACOBO MF, SIMPSON J AND HERRERA-ESTRELLA L. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant physiology* 129: 244-256.
- LUX A, MARTINKA M, VACULÍK M AND WHITE PJ. 2010. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of experimental botany* 62: 21-37.
- LYNCH J AND BROWN KM. 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiologia Plantarum* 100: 613-619.
- MA JF, YAMAJI N, MITANI N, TAMAI K, KONISHI S, FUJIWARA T, KATSUHARA M AND YANO M. 2007. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448: 209-212.
- MARSCHNER H. 1961. 1995, Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- MARSCHNER H AND RÖMHELD V 1995. Strategies of plants for acquisition of iron. *Iron nutrition in soils and plants: Springer*, p. 375-388.
- MARSCHNER H, RÖMHELD V, HORST W AND MARTIN P. 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149: 441-456.
- MARZADORI C, CIAVATTA C, MONTECCHIO D AND GESSA C. 1996. Effects of lead pollution on different soil enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils* 22: 53-58.
- MATUSOVA R, RANI K, VERSTAPPEN FW, FRANSSEN MC, BEALE MH AND BOUWMEESTER HJ. 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant physiology* 139: 920-934.
- MEYER CJ, PETERSON CA AND BERNARDS MA. 2011a. A comparison of suberin monomers from the multiseriate exodermis of *Iris germanica* during maturation under differing growth conditions. *Planta* 233: 773-786.
- MEYER CJ, PETERSON CA AND BERNARDS MA. 2011b. Spatial and temporal deposition of suberin during maturation of the onion root exodermis. *Botany* 89: 119-131.
- MISSON J, THIBAUD M-C, BECHTOLD N, RAGHOTHAMA K AND NUSSAUME L. 2004. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1; 4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant molecular biology* 55: 727-741.
- MIYAWAKI K, MATSUMOTO-KITANO M AND KAKIMOTO T. 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* 37: 128-138.

- MOLINA I, LI-BEISSON Y, BEISSON F, OHLROGGE JB AND POLLARD M. 2009. Identification of an Arabidopsis feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant physiology* 151: 1317-1328.
- NASEER S, LEE Y, LAPIERRE C, FRANKE R, NAWRATH C AND GELDNER N. 2012. Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 10101-10106.
- NIBAU C, GIBBS D AND COATES J. 2008. Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist* 179: 595-614.
- NORTHCOTE D, DAVEY R AND LAY J. 1989. Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells. *Planta* 178: 353-366.
- PÉREZ-TORRES C-A, LÓPEZ-BUCIO J, CRUZ-RAMÍREZ A, IBARRA-LACLETTE E, DHARMASIRI S, ESTELLE M AND HERRERA-ESTRELLA L. 2008. Phosphate Availability Alters Lateral Root Development in Arabidopsis by Modulating Auxin Sensitivity via a Mechanism Involving the TIR1 Auxin Receptor. *The Plant cell* 20: 3258-3272.
- PEREZ-TORRES CA, LOPEZ-BUCIO J, CRUZ-RAMIREZ A, IBARRA-LACLETTE E, DHARMASIRI S, ESTELLE M AND HERRERA-ESTRELLA L. 2008. Phosphate Availability Alters Lateral Root Development in Arabidopsis by Modulating Auxin Sensitivity via a Mechanism Involving the TIR1 Auxin Receptor. *The Plant Cell Online* 20: 3258-3272.
- PERUMALLA C AND PETERSON CA. 1986. Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Canadian Journal of Botany* 64: 1873-1878.
- PETERSON CA, EMANUEL ME AND HUMPHREYS G. 1981. Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Canadian Journal of Botany* 59: 618-625.
- PETERSON CA AND ENSTONE DE. 1996. Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum* 97: 592-598.
- PETERSON CA AND PERUMALLA CJ. 1990. A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 113-125.
- PETERSON R. 1992. Adaptations of root structure in relation to biotic and abiotic factors. *Canadian Journal of Botany* 70: 661-675.
- PEUKE A AND JESCHKE W. 1998. The effects of light on induction, time courses, and kinetic patterns of net nitrate uptake in barley. *Plant, cell & environment* 21: 765-774.
- PEUKE AD, JESCHKE WD AND HARTUNG W. 1994. The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. III. Long-distance transport of abscisic acid depending on nitrogen nutrition and salt stress. *Journal of experimental botany* 45: 741-747.
- PFISTER A, BARBERON M, ALASSIMONE J, KALMBACH L, LEE Y, VERMEER JE, YAMAZAKI M, LI G, MAUREL C AND TAKANO J. 2014. A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *Elife* 3: e03115.
- POLLARD M, BEISSON F, LI Y AND OHLROGGE JB. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13: 236-246.
- POZUELO JM, ESPELIE KE AND KOLATTUKUDY P. 1984. Magnesium deficiency results in increased suberization in endodermis and hypodermis of corn roots. *Plant physiology* 74: 256-260.
- RADIN JW AND MATTHEWS MA. 1989. Water transport properties of cortical cells in roots of nitrogen-and phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant physiology* 89: 264-268.
- RANATHUNGE K, KOTULA L, STEUDLE E AND LAFITTE R. 2004. Water permeability and reflection coefficient of the outer part of young rice roots are differently affected by closure of water channels (aquaporins) or blockage of apoplastic pores. *Journal of experimental botany* 55: 433-447.

- RANATHUNGE K, SCHREIBER L AND FRANKE R. 2011. Suberin research in the genomics era—new interest for an old polymer. *Plant Science* 180: 399-413.
- RANATHUNGE K, STEUDLE E AND LAFITTE R. 2003. Control of water uptake by rice (*Oryza sativa* L.): role of the outer part of the root. *Planta* 217: 193-205.
- RAUSER WE. 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant physiology* 109: 1141.
- REINHARDT D AND ROST T. 1995. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and experimental Botany* 35: 563-574.
- REMANS T, NACRY P, PERVENT M, FILLEUR S, DIATLOFF E, MOUNIER E, TILLARD P, FORDE BG AND GOJON A. 2006. The Arabidopsis NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 19206-19211.
- ROBBINS NE, TRONTIN C, DUAN L AND DINNENY JR. 2014. Beyond the barrier: communication in the root through the endodermis. *Plant physiology* 166: 551-559.
- ROMERA FJ AND ALCANTARA E. 1994. Iron-deficiency stress responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots (a possible role for ethylene?). *Plant physiology* 105: 1133-1138.
- ROMERA FJ, ALCANTARA E AND DE LA GUARDIA MD. 1999. Ethylene Production by Fe-deficient Roots and its Involvement in the Regulation of Fe-deficiency Stress Responses by Strategy I Plants. *Annals of botany* 83: 51-55.
- ROPPOLO D, BOECKMANN B, PFISTER A, BOUTET E, RUBIO MC, DÉNERVAUD-TENDON V, VERMEER JE, GHEYSELINCK J, XENARIOS I AND GELDNER N. 2014. Functional and evolutionary analysis of the CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN family. *Plant physiology* 165: 1709-1722.
- RUYTER-SPIRA C ET AL. 2011. Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant physiology* 155: 721-734.
- SAKAKIBARA H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 431-449.
- SATTELMACHER B. 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 149: 167-192.
- SCHACHTMAN DP. 2015. The role of ethylene in plant responses to K⁺ deficiency. *Frontiers in plant science* 6: 1153.
- SCHIKORA A AND SCHMIDT W. 2002. Formation of transfer cells and H⁺-ATPase expression in tomato roots under P and Fe deficiency. *Planta* 215: 304-311.
- SCHMIDT W AND BARTELS M. 1996. Formation of root epidermal transfer cells in *Plantago*. *Plant physiology* 110: 217-225.
- SCHRAUT D, HEILMEIER H AND HARTUNG W. 2005. Radial transport of water and abscisic acid (ABA) in roots of *Zea mays* under conditions of nutrient deficiency. *Journal of experimental botany* 56: 879-886.
- SCHREIBER L, FRANKE R, HARTMANN K-D, RANATHUNGE K AND STEUDLE E. 2005. The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of experimental botany* 56: 1427-1436.
- SCHREIBER L, FRANKE R AND HARTMANN K 2007. Chemical composition of apoplastic transport barriers in roots. *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions*: Springer, p. 109-117.
- SCHREIBER L, HARTMANN K, SKRABS M AND ZEIER J. 1999. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of experimental botany* 50: 1267-1280.

- SMITH K AND ROBERTSON P. 1971. Effect of ethylene on root extension of cereals. *Nature* 234: 148.
- SONG W, LIU S, MENG L, XUE R, WANG C, LIU G, DONG C, WANG S, DONG J AND ZHANG Y. 2015. Potassium deficiency inhibits lateral root development in tobacco seedlings by changing auxin distribution. *Plant and soil* 396: 163-173.
- SOUKUP A, ARMSTRONG W, SCHREIBER L, FRANKE R AND VOTRUBOVA O. 2007. Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *The New phytologist* 173: 264-278.
- SOUKUP A, MALÁ J, HRUBCOVÁ M, KÁLAL J, VOTRUBOVÁ O AND CVIKROVÁ M. 2004. Differences in anatomical structure and lignin content of roots of pedunculate oak and wild cherry-tree plantlets during acclimation. *Biologia plantarum* 48: 481-489.
- SOUKUP A, VOTRUBOVÁ O AND ČÍŽKOVÁ H. 2002. Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* 153: 277-287.
- STARRACH N AND MAYER W-E. 1986. Unequal distribution of fixed negative charges in isolated cell walls of various tissues in primary leaves of *Phaseolus*. *Journal of plant physiology* 126: 213-222.
- STEUDLE E. 1994. Water transport across roots. *Plant and Soil* 167: 79-90.
- STEUDLE E AND PETERSON CA. 1998. How does water get through roots? *Journal of experimental botany* 49: 775-788.
- SUN H, TAO J, LIU S, HUANG S, CHEN S, XIE X, YONEYAMA K, ZHANG Y AND XU G. 2014. Strigolactones are involved in phosphate- and nitrate-deficiency-induced root development and auxin transport in rice. *Journal of experimental botany* 65: 6735-6746.
- TAIZ L AND ZEIGER E. 2010. *Plant physiology* 5th Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- TAKANO J, TANAKA M, TOYODA A, MIWA K, KASAI K, FUJI K, ONOUCHI H, NAITO S AND FUJIWARA T. 2010. Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 5220-5225.
- TAKEI K, UEDA N, AOKI K, KUROMORI T, HIRAYAMA T, SHINOZAKI K, YAMAYA T AND SAKAKIBARA H. 2004. AtIPT3, an Arabidopsis isopentenyltransferase gene, is a key determinant of macronutrient-responsive cytokinin biosynthesis. *Plant & cell physiology* 45: 1053-1062.
- TANDY S, SCHULIN R AND NOWACK B. 2006. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere* 62: 1454-1463.
- TORREY JG. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *Bioscience* 28: 586-592.
- TYERMAN S, BOHNERT H, MAUREL C, STEUDLE E AND SMITH J. 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of experimental botany*: 1055-1071.
- VAN FLEET DS. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. *The Botanical Review* 27: 165-220.
- VYSOTSKAYA LB, TREKOZOVA AW AND KUDOYAROVA GR. 2016. Effect of phosphorus starvation on hormone content and growth of barley plants. *Acta physiologiae plantarum* 38: 108.
- WAN X, STEUDLE E AND HARTUNG W. 2004. Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): effects of ABA and of HgCl₂. *Journal of experimental botany* 55: 411-422.
- WANG Y, LI K AND LI X. 2009. Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology* 166: 1637-1645.

- WEI JIN C, YOU GY AND ZHENG SJ. 2008. The iron deficiency-induced phenolics secretion plays multiple important roles in plant iron acquisition underground. *Plant signaling & behavior* 3: 60-61.
- WEIJERS D, NEMHAUSER J AND YANG Z. 2018. Auxin: small molecule, big impact. *Journal of experimental botany* 69: 133-136.
- YADAV V, MOLINA I, RANATHUNGE K, CASTILLO IQ, ROTHSTEIN SJ AND REED JW. 2014. ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 26: 3569-3588.
- YANG SF AND HOFFMAN NE. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual review of plant physiology* 35: 155-189.
- YEO A, YEO M AND FLOWERS T. 1987. The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *Journal of experimental botany* 38: 1141-1153.
- YONEYAMA K, XIE X, KUSUMOTO D, SEKIMOTO H, SUGIMOTO Y, TAKEUCHI Y AND YONEYAMA K. 2007. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227: 125-132.
- ZAŽÍMALOVÁ E, KŘEČEK P, SKŮPA P, HOYEROVA K AND PETRÁŠEK J. 2007. Polar transport of the plant hormone auxin—the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and molecular life sciences* 64: 1621-1637.
- ZEIER J, RUEL K, RYSER U AND SCHREIBER L. 1999. Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209: 1-12.
- ZEIER J AND SCHREIBER L. 1998. Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206: 349-361.
- ZHAO X-H, QIU H, WEN J, WANG X, DU Q, WANG J AND WANG Q. 2016. Response of root morphology, physiology and endogenous hormones in maize (*Zea mays* L.) to potassium deficiency. *Journal of integrative agriculture* 15: 785-794.
- ZHU J AND LYNCH JP. 2004. The contribution of lateral rooting to phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*) seedlings. *Functional Plant Biology* 31: 949-958.
- ZIMMERMANN HM, HARTMANN K, SCHREIBER L AND STEUDLE E. 2000. Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210: 302-311.
- ZIMMERMANN HM AND STEUDLE E. 1998. Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206: 7-19.