

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní plán: Experimentální biologie rostlin – Fyziologie a anatomie rostlin

Studijní obor: NEBR



Vliv diferenciacie exodermis na lokalizaci příjmu živin v kořeni

Effect of exodermis differentiation on nutrient uptake localization in root

Bc. Jana Janoušková

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Edita Tylová, PhD.

Konzultant: RNDr. Aleš Soukup, PhD.

Praha 2018

Prohlášení

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

V Praze dne 16. 7. 2018

Jana Janoušková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Editě Tylové, PhD. za přátelský přístup, ochotu, dostupnost a odpovědné vedení mé práce. Taktéž děkuji RNDr. Aleši Soukupovi, PhD. za možnost konzultace některých kroků mé práce, rady a vedení laboratoře. Obrovské díky za podporu jak psychickou, tak manuální, rady nejen vědecké a zpříjemnění času tráveného v laboratoři patří naší skvělé laborantce a přítelkyni Ing. Yvettě Šefrnové, která mi byla nápomocná kdykoli jsem ji potřebovala a také děkuji všem členům naší laboratoře za věcné rady, pomoc s focením na konfokálním mikroskopu, předávání zkušeností a milou atmosféru. Ráda bych také poděkovala RNDr. Radku Macháňovi, PhD. za pomoc s tvorbou snímků mých preparátů metodou FLIM na konfokálním mikroskopu v Biocevu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíle práce	3
2. Teoretická část	4
2.1. Radiální transport látek kořenem	4
2.2. Apoplastická cesta	5
2.3. Symplastická cesta	5
2.4. Transcelulární cesta	6
2.5. Anatomická stavba kořene a její vliv na příjem a transport látek	6
2.5.1. Rhizodermis	6
2.5.2. Apoplastické bariéry	7
2.5.2.1. Endodermis	7
2.5.2.2. Exodermis	10
2.6. Plasticita vývoje exodermis v odpovědi na podmínky prostředí	12
2.7. Vliv přítomnosti exodermis na transportní vlastnosti kořene	13
2.8. Lokalizace příjmu živin v kořeni	14
2.9. Vliv přítomnosti exodermis na lokalizaci membránových transportérů v kořeni	16
3. Metodika	18
3.1. Vliv nedostatku fosforu (P) na růst a diferenciaci apoplastických bariér u 6 kultivarů ječmene <i>Hordeum vulgare</i> (Experiment 1)	18
3.1.1. Pěstování rostlin	18
3.1.2. Analýza kvantitativních fenotypových znaků	20
3.1.3. Anatomická analýza kořenů	20
3.1.4. Statistické vyhodnocení	20
3.2. Detailní analýza růstu kultivarů ječmene v P deficientních podmínkách (Experiment 2)	21
3.3. Lokalizace vysokoafinitních membránových transportérů fosfátu u ječmene <i>Hordeum vulgare</i> pomocí protilátky HvPht1;1,2	21
3.3.1. Experiment 3 – rostliny pěstované v 0 μ M P	22
3.3.2. Anatomická analýza kořenů	22
3.3.3. Imunodetekce fosfátových transportérů pomocí protilátky Anti – HvPht1-1, 2	22
3.3.4. Experiment 4 – rostliny pěstované v 10 μ M P	24
3.3.5. Pěstování rostlin	24
3.3.6. Histochemické barvení a imunodetekce	24
3.3.7. Plazmolýza	25
3.4. Příprava rýže (<i>Oryza sativa</i> cv. Nipponbare) nesoucí translační fúzi transportéru křemíku Lsi1 s GFP	25

3.4.1. Design klonování.....	25
3.4.2. Izolace genomové DNA z kořenů rýže <i>Oryza sativa</i> cv. Nipponbare pomocí CTAB	27
3.4.3. Izolace mRNA z rýže <i>Oryza sativa</i> cv. Nipponbare a příprava cDNA	29
3.4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR) – amplifikace <i>OsLsi1</i>	30
3.4.5. Agarózová gelová elektroforéza	32
3.4.6. Klonování MultiSite Gateway – BP (nebo TA) a LR reakce	33
3.4.7. Elektroporace	33
3.4.8. Příprava ploten	34
3.4.9. Kontrolní PCR kolonií (Colony PCR) a příprava miniprepu	34
3.4.10. Kontrolní restrikce	35
3.4.11. Příprava kalusu	36
3.4.12. Infekce kalusu pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
3.5. Regenerace rostliny z kalusu	37
4. Výsledky.....	38
4.1. Vliv nedostatku fosforu (P) na růst a diferenciaci apoplastických bariér u 6 kultivarů ječmene <i>Hordeum vulgare</i> (Experiment 1)	38
4.1.1. Fenotypové rozdíly mezi jednotlivými kultivary a vliv deficience P	38
4.1.2. Apoplastické bariéry	42
4.2. Fenotypové rozdíly mezi jednotlivými kultivary v deficienci P – Experiment 2	46
4.3. Lokalizace fosfátových transportérů v kořenech rostlin vystavených deficienci P (14 dní v 0 μ M P) – Experiment 3.....	48
4.4. Lokalizace fosfátových transportérů v kořenech rostlin vystavených deficienci P (21 dní v 10 μ M P) – Experiment 4.....	55
4.4.1. Pásková plazmolýza	55
4.5. Transformace rýže (<i>Oryza sativa</i>) – translační fúze <i>pOsLsi1::OsLsi:GFP</i>	60
4.5.1. Příprava konstruktů	60
4.5.2. Testovací transformace pomocí <i>Agrobacterium</i> nesoucím konstrukt s volným GFP.....	60
4.5.3. Příprava kalusu a regenerace rostlin	63
5. Diskuze.....	64
5.1. Vliv nedostatku P na růst rostlin a utváření exodermis v kořenech ječmene	64
5.1.1. Růstová odpověď jednotlivých kultivarů na nedostatek P	64
5.1.2. Diferenciace exodermis pod vlivem nedostatku P	65
5.2. Vliv diferenciace exodermis na lokalizaci membránových transportérů fosfátu v primární kůře.....	67
5.2.1. Imunodetekce fosfátových transportérů	67
5.3. Vliv suberinové lamely.....	70
6. Závěr	71

7. Použitá literatura.....	72
----------------------------	----

Abstrakt

Díky svému plastickému vývoji jsou rostliny schopné čelit měnícím se podmínkám prostředí či odolávat jeho nepříznivým vlivům. Jednou z možností, jak se přizpůsobit kolísavému množství živin a vody v prostředí či přítomnosti toxických látek, je regulace pohybu látek mezi rostlinou a okolím. Tato regulace je umožněna také na úrovni kořenového systému, a to mimo jiné tvorbou apoplastických bariér endodermis a exodermis. Některé druhy tvoří pouze endodermis, u jiných lze nalézt i exodermis v podkožkových vrstvách kořene. Tyto bariéry procházejí diferenciací v několika stupních a brání volnému pohybu látek apoplastem. Přechod do symplastu je klíčovým místem regulace příjmu látek do rostliny a endodermis v tomto směru představuje zásadní strukturu. Přítomnost exodermis však ovlivňuje propustnost apoplastu povrchových vrstev kořene a může proto ovlivnit zapojení buněk primární kůry v příjmu látek z prostředí.

V této práci byl zkoumán vliv deficiencie fosfátu na tvorbu apoplastických bariér, se zaměřením na exodermis a vliv její diferenciaci na výskyt membránových transportérů a zapojení buněk primární kůry v příjmu živin. Hydroponicky pěstované rostliny ječmene (*Hordeum vulgare*) v kultivačním roztoku bez fosfátu vykazovaly přítomnost exodermis, zatímco u kontrolní rostliny deficiencie exodermis neproběhla, což potvrzuje vliv deficiencie živin na urychlené ukládání apoplastických bariér.

Lokalizace transportérů a jejich přítomnost v místě apoplastických bariér byla zjišťována metodou imunodetekce. Pro tuto metodu byly vybrány vysokoafinitní transportéry fosfátu HvPht1;1 a 2, jejichž exprese je stimulována nízkými koncentracemi fosfátu. Ve dvou opakováních byla potvrzena změna distribuce těchto transportérů v pletivech kořene. V blízkosti kořenové špičky byla jejich přítomnost pozorována ve stejné míře v rhizodermis i primární kůře. Dále od špičky signál protilátky ve střední části primární kůry slábnul a byl výrazněji patrný pouze v povrchových vrstvách kořene, přestože diferenciaci exodermis nebyla v těchto místech detekována, což však nemusí znamenat, že její tvorba již nezačala.

Další částí této práce byla snaha připravit rýži nesoucí translační fúzi GFP s transportérem Lsi1, avšak z časových důvodů nebyla transformace dokončena. Lsi1 slouží pro vstup křemíku do cytosolu a byl lokalizován v místě apoplastických bariér. Tento pokus mohl přispět k objasnění vlivu přítomnosti suberinové lamely na výskyt transportérů.

Klíčová slova: ječmen, kultivar, transport, exodermis, deficiencie, fosfát, Casparyho proužek, suberinová lamela

Abstract

Plants are able to cope with changing environmental conditions or withstand its adverse effects due to their plastic development. One way to adapt to fluctuating amounts of nutrients and water in the environment or the presence of toxic substances is to regulate the movement of substances between the plant and the environment. Beside other, this regulation is also possible at the level of the root system, by the formation of apoplastic barriers endodermis and exodermis. Some species possess endodermis only, in others exodermis in hypodermal layers of the root can be found. These barriers differentiate in three stages and prevent free movement of compounds through apoplast. The transport to the symplast is the key point of regulating the uptake of substances into the plant and the endodermis is the fundamental structure. The presence of exodermis, however, affects the apoplast permeability of the surface root layers and can therefore influence the involvement of the primary cortex cells in the uptake of substances from the environment.

In this work the impact of phosphate deficiency on the formation of apoplastic barriers was studied focusing on exodermis and the effect of its differentiation on the occurrence of membrane transporters and involvement of primary cortex cells in the uptake of nutrients. Hydroponically grown barley plants (*Hordeum vulgare*) in the phosphate deficient nutrient solution showed the presence of exodermis whereas exodermis was absent in the control plant. This result confirms the stimulatory effect of phosphate deficiency on apoplastic barriers establishment within root tissues.

Localization of transporters and their presence at the site of apoplastic barriers was determined by the immunodetection method. For this method high-affinity phosphate transporters HvPht1;1 and 2 were selected. Their expression was previously shown to be enhanced in low phosphate conditions. In two experiments a redistribution of these transporters within the root tissues was confirmed. Near the root tip their presence was observed to the same extent in the rhizodermis and the primary cortex. Further from the tip the antibody signal in the central part of the primary cortex was significantly lower compared to the root surface layers although the exodermis differentiation was not detected at these sites. However it does not mean that its production has not begun.

Another aim of this thesis was preparation of the transgenic rice carrying the GFP translation fusion with the Lsi1 transporter but for the time reasons the transformation was not completed. Lsi1 serves the uptake of silicon into the cytosol and is located in the cells of the apoplastic barriers. This effort could contribute to clarifying the influence of suberin lamellae presence on the occurrence of transporters.

Keywords: barley, cultivar, transport, exodermis, deficiency, phosphate, Casparian strip, suberin lamellae

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
AtAMT	z angl. <i>Arabidopsis thaliana</i> Ammonium transporter
AtBOR1	z angl. <i>Arabidopsis thaliana</i> Boron efflux carrier 1
AtNIP	z angl. <i>Arabidopsis thaliana</i> Nodulin26-like major Intrinsic Proteins
BSA	z angl. Bovine Serum Albumin
CIF1, 2	z angl. CASPARIAN STRIP INTEGRITY FACTOR 1, 2
CP	Casparyho proužky
CTAB	Cetrimoniumbromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
FLIM	z angl. Fluorescence – lifetime imaging microscopy
FM4 – 64	N-(3-triethylamoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)fenyl)hexa-trienyl)pyridiniumbromid
GFP	z angl. green flourescent protein
HvPht1;1 a 2	z angl. <i>Hordeum vulgare</i> phosphate transporter 1;1 a 2
LB	z angl. lysogeny broth (nutričně bohaté médium)
NAA	z angl. Naphthaleneacetic acid
Nramp5	z angl. Natural resistance associated Macrophage protein 5
OsAMT1;1, 2	z angl. <i>Oryza sativa</i> Ammonium transporter 1; 1, 2
OsLsi1	z angl. <i>Oryza sativa</i> Low silicon rice 1
PBS	z angl. Phosphate Buffered Saline
PCR	z angl. polymerase chain reaction
PER64	Peroxidáza 64
PTS	trisodium 3-hydroxy-5,8,10-pyrentrisulfonát
PVP	polyvinylpyrrolidon
RNA	ribonukleová kyselina
RT – PCR	z angl. reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodiumdodecylsulfát
SEL	z angl. Size exclusion limit
SGN 3 a 1	Schengen kinázy 3 a 1
SL	suberinové lamely
SOC 1	z angl. Super Optimal broth with Catabolite repression
StPT2	z angl. <i>Solanum tuberosum</i> Phosphate transporter
Tm	z angl. temperature melting
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan
ZmPIP	z angl. <i>Zea mays</i> plasma membrane intrinsic protein

1. Úvod

Touto diplomovou prací navazuji na svou bakalářskou práci, ve které jsem zmapovala informace o transportu vybraných živin, respektive lokalizaci transportérů živin v kořeni. Z tohoto souboru informací vyplynulo, že existuje poměrně málo konkrétních informací o tom, zda a jak tuto lokalizaci ovlivňuje postupná diferenciacie exodermis. V diplomové práci jsem se proto snažila na tuto otázku odpovědět pomocí laboratorních pokusů. Obě mé práce vznikly v laboratoři Fyziologické anatomie.

Většinu potřebných (ale i toxických) látek a vodu získává rostlina kořenovým systémem. Než – li se však tyto látky dostanou z rhizosféry do nadzemní části rostliny, musí překonat několik vrstev buněk, až jsou cévními svazky rozváděny po rostlině. Radiální transport látek kořenem od povrchu až do středního válce probíhá dvěma hlavními způsoby – symplastem a apoplastem. Recentní práce pak uvažují také existenci transcelulární cesty (Barberon a Geldner, 2014). Tyto tři způsoby se navíc v různé míře kombinují.

Jako první přijde látka do kontaktu s pokožkou, tzv. rhizodermis, která bývá jednovrstevná. Časem může odumírat. Pod pokožkou se nachází primární kůra, která dává vzniknout jedné až dvěma apoplastickým bariérám – endodermis a exodermis. Vnitřní vrstvou primární kůry je pro většinu rostlin klíčová endodermis, zatím co exodermis je vnější vrstvou - jen u některých rostlin (Damus et al., 1997; Perumalla et al., 1990)

Radiální transport přes apoplastické bariéry je v některých případech zajištěn více či méně specifickými transportéry, jejichž lokalizace se s vývojem kořene může měnit.

Většina membránových transportérů je lokalizována na plazmatických membránách rhizodermis, případně buněk primární kůry, čímž probíhá příjem látek (např. fosfor, dusík) do symplastu a touto cestou se dále pohybují do středního válce. U některých látek (bor, křemík, vápník) byl pozorován jejich pohyb přes endodermis či exodermis transcelulární cestou, kdy se jejich membránové transportéry vyskytují především na úrovni apoplastických bariér. V případě aquaporinů (transportéry vody) dochází ke kombinaci obou těchto možných lokalizací transportérů. Přítomnost suberinové lamely však brání látkám přístupu k plazmatické membráně. Tudíž je – li suberinová lamela diferencována, přítomnost transportérů by zde postrádala význam. V souvislosti s postupnou diferenciací exodermis jsou tedy zajímavé dvě otázky. Míží přítomnost membránových transportérů živin v primární kůře v těsné korelaci se vznikem Casparyho proužků

v exodermis? Jaký dopad má uložení suberinové lamely na přítomnost transportérů, které jsou přednostně lokalizovány právě v endodermální/exodermálních buňkách?

Práci, které by se touto otázkou detailně zabývaly, existuje jen minimum. Studie charakterizující funkci konkrétních transportérů živin u kukuřice nebo rýže (druhů tvořících exodermis), ukazují, že distribuce těchto transportérů se může v různých částech kořene lišit (Liu et al., 2015; Mitani et al., 2009).

Zda tato změna koreluje s postupem diferenciací exodermis však nelze jednoznačně říci, protože modifikace buněčných stěn exodermálních buněk (přítomnost Casparyho proužků nebo suberinových lamel) nebyla v těchto pracích hodnocena. Pouze jeden nám známý článek se detailně zabývá touto korelací. Autoři Hachez a kol. zkoumali lokalizaci transportérů vody u kukuřice v různě starých částech kořene a korelovali ji s postupným vývojem exodermis (Hachez et al., 2006a). Pozorovali zvýšení exprese těchto transportérů ve starších částech kořene, především v místě exodermis a endodermis.

Pro tuto diplomovou práci a pro získání odpovědi na otázku, jakým způsobem diferenciací exodermis ovlivňuje distribuci membránových transportérů živin, byl modelovou rostlinou zvolen ječmen (*Hordeum vulgare*), neboť tvoří exodermis (především ve stresových podmínkách) a byly dostupné protilátky k imunodetekci fosfátových transportérů HvPht1;1 a HvPht1;2 (*Hordeum vulgare* phosphate transporter). Výskyt těchto transportérů v rýži nesoucí translační fúzi HvPht1;1, 2 pod ubiquitinovým promotorem byl pozorován v hlavním kořeni především v buňkách rhizodermis, méně v oblasti primární kůry. V mladých postranních kořenech byla exprese *HvPht1;1* lokalizována především v primární kůře a jen minimálně v rhizodermis. To naznačuje možnou změnu v lokalizaci v souvislosti s postupem diferenciací hypodermálních vrstev (Schunmann, 2004). Expese těchto transportérů roste při deficienci, což naznačuje jejich roli v příjmu fosfátu z prostředí (Schunmann, 2004). Detekce HvPht1;1, 2 v kořenech ječmene v korelaci s analýzou postupu diferenciací exodermis tak může přinést informaci o zapojení pokožky a primární kůry v příjmu fosfátu v reálných podmínkách.

Druhou, nově zaváděnou metodou v naší laboratoři, která by umožnila charakterizovat dopad uložení suberinové lamely na přítomnost membránových transportérů živin v endodermálních/exodermálních buňkách, byla příprava rýže (*Oryza sativa*) nesoucí translační fúzi transportéru křemíku Lsi1 s GFP. Tento kanál pro vstup kyseliny křemičité je lokalizován právě v buňkách apoplastických bariér (Ma et al., 2007). Cílem této části práce bylo i samotné zavedení a optimalizace metodiky transformace rýže.

1.1. Cíle práce

Diplomová práce si klade za cíl odpovědět na otázku, zda dochází s postupem diferenciací exodermis ke změně v lokalizaci membránových transportérů živin v pokožce a primární kůře kořene (tj. ke změně zapojení jednotlivých membrán v příjmu živin z prostředí). Dále sleduje, zda dostupnost živin ovlivňuje samotný průběh diferenciací exodermis.

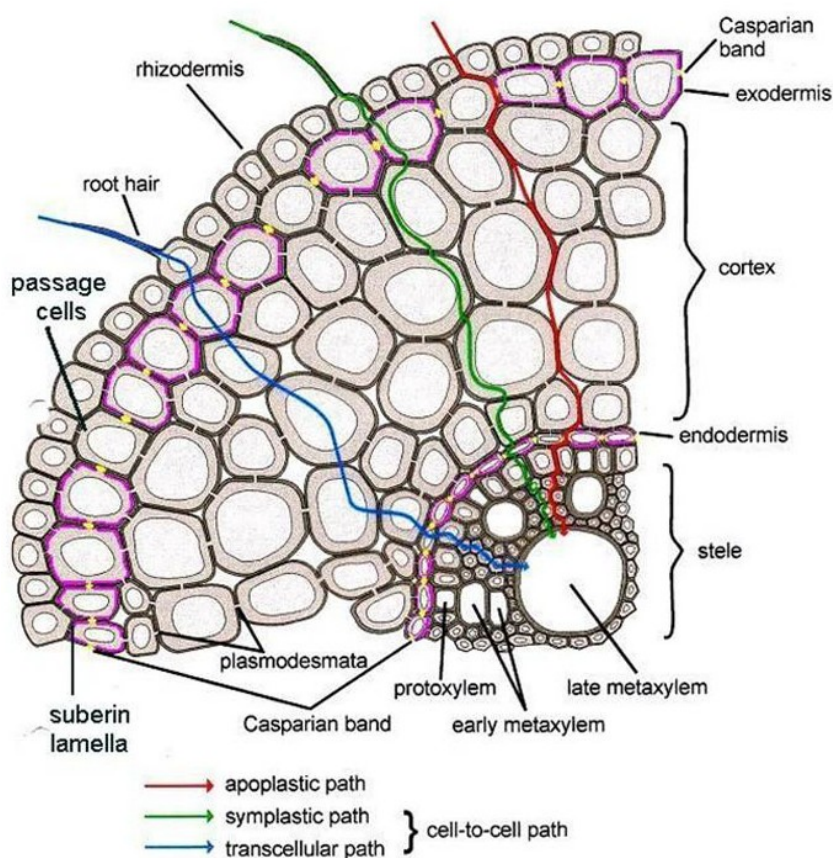
Konkrétní cíle práce jsou následující:

1. Analyzovat vliv deficiencie fosforu na průběh diferenciací exodermis u ječmene jako modelové rostliny
2. Charakterizovat lokalizaci membránových transportérů fosfátu u ječmene a korelovat ji s vývojem exodermis
3. Zavést a optimalizovat metodiku transformace rýže a připravit rýži nesoucí translační fúzi GFP s membránovým transportérem křemíku (Lsi1)

2. Teoretická část

2.1. Radiální transport látek kořenem

Kořeny slouží rostlině, mimo jiné, především k příjmu vody a živin. Tyto látky jsou transportovány do nadzemních částí a do míst spotřeby, avšak před vstupem do středního válce a cévních svazků musí nejprve v radiálním směru překonat několik vrstev – pokožku, tedy rhizodermis a primární kůru s endodermis příp. i exodermis. Radiální transport může být zprostředkován třemi možnými způsoby (obr. 1). V první řadě cestou apoplastickou a symplastickou (Taiz a Zeiger, 2014), v řadě druhé méně prozkoumanou transcelulární cestou. Pro dosažení maximální efektivity kořenového systému zřejmě dochází ke kombinaci všech tří cest (Barberon a Geldner 2014).



Obrázek 1: Schématické znázornění apoplastických bariér a radiálního transportu látek kořenem (Kim et al., 2018).

2.2. Apoplastická cesta

Při transportu apoplastem putují látky mezibuněčným prostorem (pouze plyny) a prostorem buněčných stěn buněk pokožky, primární kůry a středního válce (Marschner, 1995). Jedná se o transport vody, plynů, organických i anorganických látek, přičemž závisí na velikosti dané molekuly a rozdílu koncentrací iontů mezi vnějším prostředím a apoplastem. Pohyb látek je poháněn prostou difúzí či hromadným tokem (Marschner, 1995). Nejen vlastnosti transportovaných látek ovlivňují rychlost pohybu. Velkou roli hraje též struktura - pórovitost a chemické složení buněčné stěny (Barberon a Geldner, 2014; Rose, 2003). Kladně nabitě částice jsou vázány (dočasně) ke karboxylovým skupinám kyselin buněčné stěny, které mají naopak náboj záporný. Prostor buněčné stěny tedy funguje jako iontoměničový systém s omezenou kapacitou (Dainty a Hope, 1961; Bernstein a Nieman, 1960). Množství aniontů buněčné stěny je označováno jako výměnná kationtová kapacita. Tato kapacita může být ovlivněna podmínkami prostředí a regulována pomocí enzymů měnících chemické vlastnosti buněčné stěny (Sattelmacher, 2000). Takovým enzymem, majícím roli v rámci vývoje rostliny, je např. pektinmethylesteráza, která katalyzuje demethylestrerifikaci polygalakturonanů (Micheli, 2001). Rozdíl je také mezi primární a sekundární buněčnou stěnou, které se liší obsahem pektinů, které přináší stěně záporný náboj. Primární stěna jich obsahuje více (Rose, 2003).

2.3. Symplastická cesta

V případě symplastické cesty jsou látky po překonání cytoplazmatické membrány transportovány cytosolem buněk, což je umožněno propojením jednotlivých buněk pomocí plasmodesmů – kanálů obsahující endoplazmatické retikulum (desmotubulus). Protoplasty většiny buněk tak vytvářejí jedno kontinuum. Některé buňky jsou plasmodesmů prosté neboli symplasticky izolované. Jsou to například svěrací buňky průduchů (Palevitz a Hepler, 1985). Plasmodesmy nalezneme u buněk s primární i sekundární buněčnou stěnou (Lucas et al., 1993). Kromě desmotubulů obsahují plasmodesmy plazmatickou membránu, tzv. cytoplazmatický rukáv a proteiny. Množství plasmodesmů, jejich funkčnost a průchodnost se odvíjí od konkrétních stresových podmínek a části rostliny. Maximální velikost molekuly, která může být transportována, je dána limitem propustnosti označovaným SEL (z angl. Size exclusion limit). V případě potřeby může být průchodnost regulována ukládáním kalózy (β -1,3- glukan) či naopak mohou vznikat nové plasmodesmy proděravěním

stávajících stěn (Levy et al., 2007). Transport přes cytoplazmatickou membránu probíhá u některých látek difúzí, ve většině případů je však zprostředkován a regulován proteinovými přenašeči, kanály a pumpami, které se na membráně vyskytují (Marschner, 1995).

2.4. Transcelulární cesta

Recentně je uvažována a zkoumána jako další možnost transportu látek transcelulární cesta, kdy kooperují dva polarizovaně orientované transportéry vyskytující se na plazmatické membráně. Jeden slouží k přijetí látky do cytosolu, načež druhý ji opět vykládá do apoplastu, blíže směrem ke střednímu válci (Barberon a Geldner, 2014). Tento způsob transportu byl pozorován například u huseníčku, kdy je bór přijímán do buněk transportérem NIP5;1 (Nodulin26-like major Intrinsic Proteins) lokalizovaným na plazmalemě distální strany buňky, zatímco na opačné straně (blíže ke střednímu válci) je vykládán přes BOR1 (Boron eflux carrier) (Takano et al., 2010). Podrobněji bude popsáno v kapitole o lokalizaci transportérů.

2.5. Anatomická stavba kořene a její vliv na příjem a transport látek

V této části diplomové práce budou popsány anatomické struktury kořene, avšak pozornost bude věnována především těm aspektům, které jsou klíčové pro regulaci příjmu živin a jejich radiálního transportu pletivy kořene směrem do středního válce.

2.5.1. Rhizodermis

Povrch kořene je kryt převážně jednovrstevnou pokožkou, avšak například u epifytních druhů nalezneme vícevrstevnou pokožku zvanou velamen, kterou tvoří mrtvé buňky. Tyto buňky slouží jako mechanická ochrana ostatních částí kořene a regulují pohyb vody a živin (Joca et al., 2017). Rhizodermis hraje velice důležitou roli v případě příjmu látek, neboť zajišťuje kontakt kořene s prostředím a také slouží jako mechanická bariéra, která je na rozdíl od epidermis, například listu, bez kutikuly a průduchů. Látky mohou být do buněk přijaty již na úrovni rhizodermis a dál se v radiálním směru pohybovat symplastem, nebo mohou difundovat apoplastem do prostoru primární kůry. Buňky rhizodermis, ale také primární kůry (především exodermis a endodermis, v menší míře i střední části primární kůry) jsou navíc do určité míry polarizované – mají vnější (distální) a vnitřní (proximální) oblast plazmatické membrány, která se může lišit přítomností různých transportérů (Barberon a Geldner, 2014).

Polarita buněk bude detailněji popsána v kapitole Lokalizace příjmu živin v kořeni. V případě přítomnosti exodermální vrstvy (bude vysvětleno v následující kapitole), která se vytváří hned pod rhizodermis, je apoplastický transport omezen pouze na úroveň rhizodermis, což omezuje pohyb některých látek, např. kadmia a solí do vnitřních pletiv kořene (Krishnamurthy et al., 2011; Redjala et al., 2011). Životnost rhizodermis je závislá na podmínkách prostředí a stáří kořene, kdy může vlivem stresových podmínek docházet k jejímu odumírání, čímž se pak stává mechanickou bariérou bez aktivního zapojení v příjmu látek (Enstone a Peterson, 1998). Některé buňky rhizodermis tzv. trichoblasty podléhají specifické diferenciaci, a to růstu v kořenový vlásek. Díky apikálnímu růstu dosahují kořenové vlásky délky milimetrů, a tak snadno pronikají do malých pórů substrátu, čímž zvyšují prostor, ze kterého lze čerpat živiny (Jungk, 2001; Lauter et al., 1996). Například příjem fosfátu je přítomností kořenových vlásků významně ovlivněn (Gahoonia a Nielsen, 1997; Gilroy a Jones, 2000; Itoh a Barber, 1983). Množství a délka kořenových vlásků jsou ovlivněny druhem rostliny a vnějšími podmínkami, tj. množstvím dostupných živin (především P a N) (Itoh a Barber, 1983; Jungk, 2001). Jejich životnost se pohybuje v rámci dnů (Gahoonia a Nielsen, 1998).

2.5.2. Apoplastické bariéry

Rhizosféra obsahuje mimo vody a živin také látky a patogeny, které nejsou pro rostlinu přínosné či mohou být dokonce toxické (např. těžké kovy). Není tedy žádoucí tyto látky přijímat, tudíž musí docházet k selekci a regulaci přijímaných látek. Na druhou stranu je také potřeba potřebným látkám zabránit v úniku z kořene zpět do rhizosféry. Volný, neregulovaný pohyb látek apoplastem je proto regulován na úrovni apoplastických bariér – endodermis a exodermis (Obr. 1). Klíčovou roli hraje především endodermis, která se tvoří téměř u všech cévnatých rostlin. Výjimkou je *Lycopodium*, kde nebyla endodermis v kořenech detekovaná (Damus et al., 1997). Exodermis naopak najdeme jen u některých rostlin (především krytosemenných), většina výtrusných rostlin (výjimky nalezeny u čeledi *Selaginellaceae*) a nahosemenné rostliny ji netvoří (Brundrett et al., 1990; Damus et al., 1997; Hose et al., 2001). K jejich diferenciaci dochází v určité vzdálenosti od kořenové špičky v závislosti na podmínkách prostředí (Lux et al., 2004; Redjala et al., 2011; Vaculík et al., 2012)

2.5.2.1. Endodermis

Endodermis je vnitřní vrstva buněk primární kůry sousedící s pericyklem. U této vrstvy dochází k modifikacím buněčné stěny, které brání volnému pohybu vody a v ní rozpuštěných

látek a patogenů apoplastem z primární kůry do středního válce, a tedy i do nadzemních částí rostliny.

Prvním stádiem vývoje endodermální buňky je tvorba opaskovitých struktur v rámci buněčné stěny, které vznikají ukládáním polymerů ligninu (majoritní polymer) a suberinu (Naseer et al., 2012; Zeier et al., 1999) do střední části transverzálních a radiálních buněčných stěn. Tyto polymery propůjčují tzv. Casparyho proužkům (CP) hydrofobní vlastnosti (Esau, 1953; Kroemer, 1903). Casparyho proužky omezují tok vody a solutů apoplastickou cestou do středního válce a zároveň brání jejich zpětnému toku z apoplastu středního válce do apoplastu primární kůry, odkud by mohly unikat ven do rhizosféry. Transportované látky tak musí projít přes plazmalemu, kde dochází k jejich selekci. Na plazmatické membráně buněk endodermis lze nalézt četné membránové přenašeče pro transport látek z apoplastu do symplastu (Geldner, 2013).

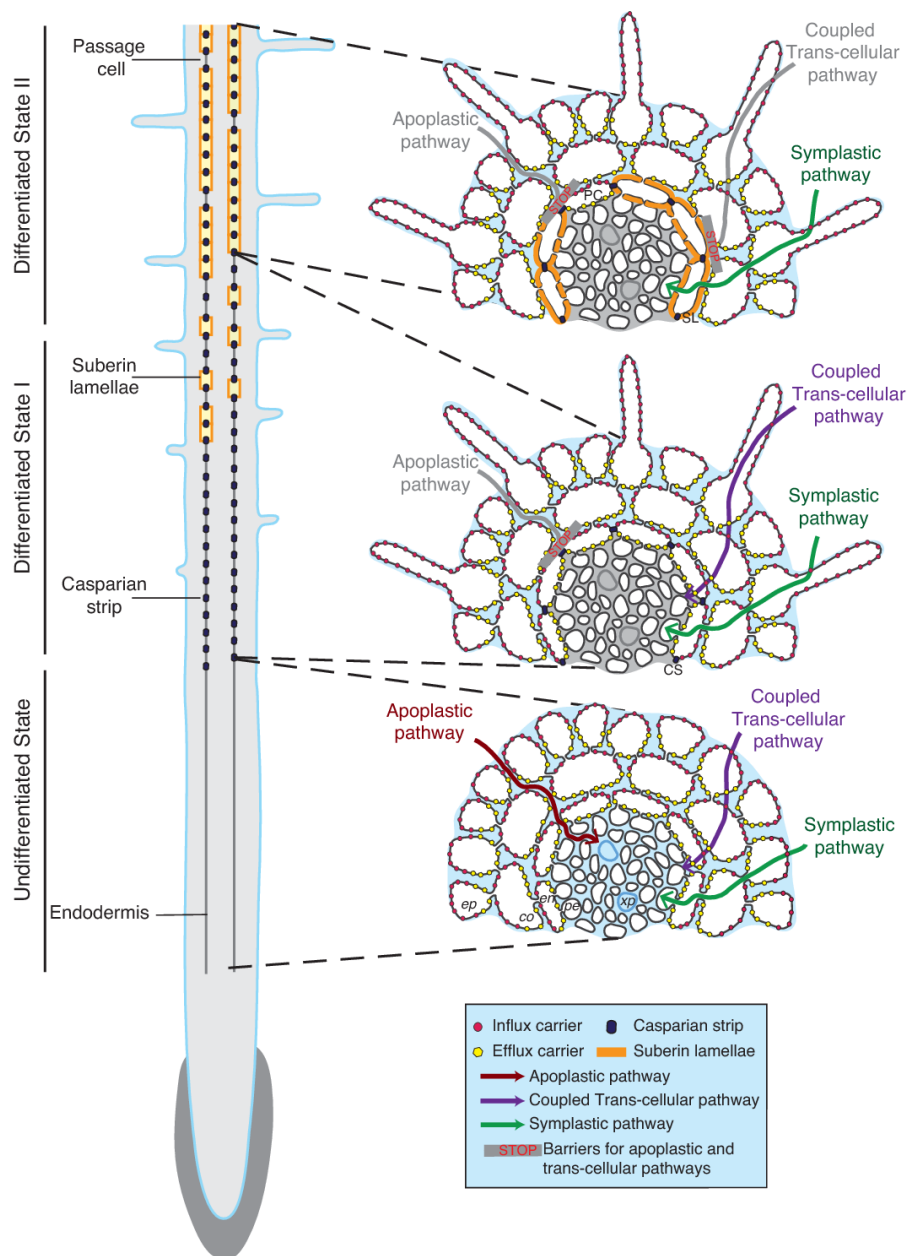
Zakládání CP je řízeno spoluprací několika genů. Dochází k němu v místě membránové domény Casparyho proužku, jejíž správná poloha je určena přítomností specifických receptorových kináz Schengen 3 a 1 (Velasquez a Kleine-Vehn, 2016) a kde se vyskytují specifické proteiny - Casparian strips domain proteins důležité pro správnou formaci této struktury (Roppolo et al., 2014, 2011). Receptorová kináza SGN3 (SCHENGEN 3) je odpovědná za tvorbu kontinuálního prstence CP (Pfister et al., 2014). Recentně objevené proteiny exprimované ve středním válci – CASPARIAN STRIP INTEGRITY FACTOR 1,2. (CIF1, 2) hrají roli signálu kontrolujícího integritu vznikajících CP, kdy po kontaktu s receptorem SGN3 a aktivaci SGN1 spouští lignifikaci a suberinizaci (Tena, 2017). Důležitá je také přítomnost peroxidázy PER64, bez které je ukládání CP opožděno (Lee et al., 2013). Pomocí plazmolýzy lze zjistit, zda již formace CP proběhla, neboť pak je v tomto místě protoplast spojen s buněčnou stěnou a nedochází ke ztrátě funkčnosti endodermis ani v hyperosmotických podmínkách – tzv. pásková plazmolýza (Bonnett, 1968; Geldner, 2013).

V rámci druhého vývojového stupně endodermis dochází k depozici suberinu - hydrofobní polymer s alifatickou (mastné kyseliny, glycerol a další) a fenolickou doménou (deriváty hydroxyskořicové kyseliny) - do celého prostoru mezi primární buněčnou stěnou a plazmalemu, což dává vzniknout struktuře suberinových lamel (SL) (Bernards, 2002; Zeier et al., 1999). V místě plazmodezmů se však suberin neukládá a ty tak zůstávají průchodné (Clarkson et al., 1971; Ma a Peterson, 2000). Suberinem tvořené lamely na rozdíl od CP ovlivňují zejména přechod látek z apoplastu do cytosolu endodermálních buněk, tedy

transcelulární cestu transportu (Kroemer, 1903; Barberon et al., 2016a). Zabraňují průchodu patogenům a například zvyšují rezistenci k solnému stresu či umožňují růst v zaplavovaných podmínkách (Barberon, 2017; Enstone et al., 2003).

K ukládání suberinových lamel nedochází u všech buněk endodermis najednou, ale asynchronně (Obr. 2) (Barberon, 2017; Peterson et al., 1993). Plasticita ukládání suberinových lamel je značná. Stimulují je především různé stresové faktory, jako například toxické působení kadmia (Lux et al., 2011). Recentní práce Barberon a spoluautorů ukazuje, že ukládání suberinu v endodermis ovlivňuje i dostupnost živin a v jeho regulaci jsou zapojeny některé fytohormony. Stimuluje jej kys. abscisová (ABA), inhibuje etylén. Tato práce také dokonce naznačuje, že již uložený suberin může být pod vlivem etylénu odbouráván (Barberon et al. 2016). Některé buňky apoplastických bariér zůstávají delší dobu ve stádiu CP bez SL. Jsou tedy pozorovatelné i ve starších částech kořene, kde jsou již okolní endodermální buňky suberinizovány. V takovém případě se jedná o tzv. propustné buňky (passage cells) (Meyer et al., 2011a). Předpokládá se, že usnadňují transport látek a vody a příjem látek preferujících apoplastickou cestu do úrovně endodermis, protože jejich plazmalema zůstává přístupná a umožňuje realizaci transcelulární cesty. Propustné buňky se většinou vyskytují v místech xylémových pólů (Cholewa a Peterson, 2004; Peterson a Enstone, 1996). Postupem času či vlivem podmínek se i u těchto buněk může dotvořit suberinová lamela, čímž ztratí své vodivé vlastnosti (Esau, 1953).

Posledním stupněm specifikace apoplastických bariér, a tedy terciárním vývojovým stupněm endodermis je ukládání sekundární buněčné stěny. Tento jev byl pozorován pouze u některých zástupců rostlinné říše, především jednoděložných (Enstone et al., 2003). Sekundární celulózní buněčná stěna, případně později i lignin, jsou ukládány do radiálních stěn a vnitřní periklinální stěny endodermální buňky mezi plazmalemu a suberinovou lamelu (Clarkson et al., 1971; Enstone et al., 2003; Peterson a Enstone, 1996), což dává vzniknout struktuře tvaru „U“ nebo „V“, která má zřejmě vliv na mechanickou odolnost kořene. Přítomné plazmodezmy však zůstávají funkční (Clarkson et al., 1971; Ma, 2000; Ma a Peterson, 2000).



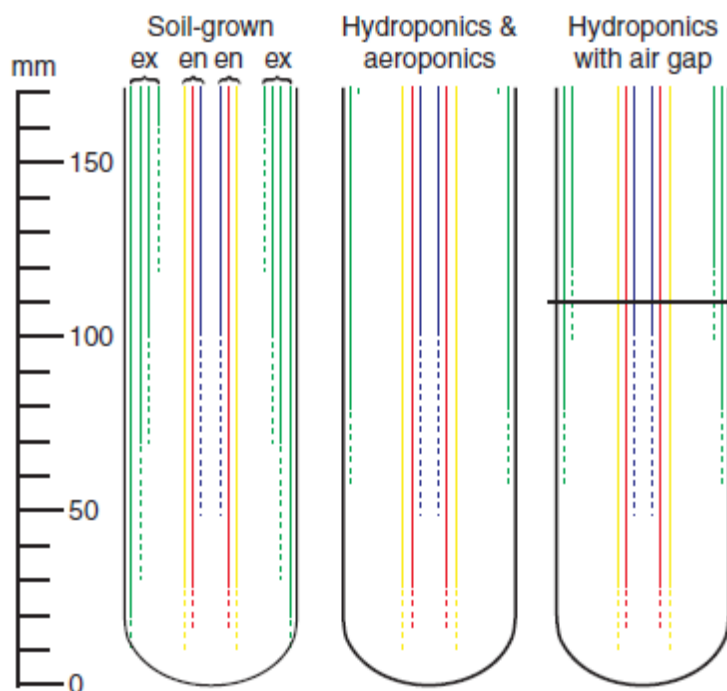
Obrázek 2: Vliv postupné diferenciacie endodermis na transportní vlastnosti kořene (Aersen et al., 2015).

2.5.2.2. Exodermis

Přídavnou apoplasičnou bariérou mnoha rostlinných druhů (vyjma např. nahosemenných rostlin) je exodermis (Damus et al., 1997; Perumalla et al., 1990), kterou nalezneme pod rhizodermis. Je tedy vnější vrstvou buněk primární kůry. Jedná se o specializovaný typ hypodermis s velice podobnou strukturou a vlastnostmi, které nalezneme u endodermis.

Exodermis se na rozdíl od endodermis většinou diferencuje později, tzn. dále od kořenové špičky (několik centimetrů oproti milimetrům). To neplatí například u rostlin rostoucích v zaplavovaných oblastech, kde její diferenciace předchází vzniku endodermis (Soukup et al., 2002). Exodermis může být jednovrstevná i vícevrstevná (Hose et al., 2001). Vícevrstevnost nalezneme častěji u mokřadních rostlin, avšak předpokládá se její prospěšnost i pro rostliny tolerantní k suchu (Meyer et al., 2009). U exodermis tedy stejně jako u endodermis nalezneme CP, dochází u ní k lignifikaci a suberinizaci a také může být ukládána sekundární buněčná stěna. Ukládání sekundární stěny je méně časté oproti endodermis. Pokud se v ojedinělých případech ukládá, nedochází ke vzniku U - ztlustlin (Enstone et al., 2003). Na rozdíl od endodermis je obsah suberinu a ligninu v exodermis nižší (Schreiber et al., 1999). SL se tvoří současně nebo vzápětí po diferenciaci CP a zabírají téměř celou délku radiálních stěn. V případě exodermis můžeme mluvit o dimorfní či uniformní podobě. Buňky uniformní exodermis jsou stejného tvaru, velikosti a neliší se v rychlosti ukládání suberinové lamely. U dimorfního typu nalezneme dlouhé suberinizované buňky střídající krátké buňky bez suberinových lamel nebo je u nich tvorba lamel opožděna. Ty pak bývají označovány opět jako propustné buňky, které usnadňují příjem látek (Hose et al., 2001; Enstone et al., 2003; Peterson a Enstone, 1996; Haberlandt, 1884).

Vývoj a růst rostliny je přítomností exodermis ovlivněn v mnoha aspektech. Následkem některých stresových činitelů může docházet k odumírání rhizodermis, načež se pak exodermis stává nejsvrchnější vrstvou kořene zastupující pokožku (Enstone et al., 2003). Je – li ve stádiu s CP i SL, je zde velice omezen příjem a transport látek, neboť není přístupná plazmatická membrána žádných buněk ani apoplast (Kamula et al., 1994). Z této skutečnosti vyplývají její protektivní schopnosti, kterými jsou zabránění ztrátám vody v podmínkách sucha a následnému poškození primární kůry a ztrátě látek v ní uložených, či naopak předcházení akumulace nežádoucích látek v apoplastu primární kůry kořene (Enstone et al., 2003).



Obrázek 3: Rozdíly diferenciacie exodermis v různých kultivačních podmínkách (Meyer et al., 2009). Air gap – bazální část kořene vystavena atmosférickým podmínkám.

2.6. Plasticita vývoje exodermis v odpovědi na podmínky prostředí

Rostliny jako sesilní organismy se musejí často vypořádat s měnícími se podmínkami prostředí. Jejich vývoj je velice plastický a na stresové faktory dokážou reagovat změnou svého růstu či jiným přizpůsobením. Jednou z možností aklimace je regulace diferenciacie apoplastických bariér, kdy se působením stresu ve většině případů diferencují blíže ke špičce. V tomto případě hraje významnější roli exodermis, která reaguje s větší variabilitou (Hose et al., 2001). Různé podmínky prostředí a stresové faktory, kterými jsou například sucho, salinita, přítomnost těžkých kovů, nadbytek či nedostatek živin a kyslíku většinou indukuje právě vznik exodermis (Enstone et al., 2003; Hose et al., 2001; Redjala et al., 2011; Vaculík et al., 2012; Zimmermann a Steudle, 1998). Například u bavlníku bylo popsáno, že salinita indukuje dřívější ukládání suberinových lamel u endodermis a diferencuje se exodermis, která v kontrolních podmínkách nevzniká (Reinhardt a Rost, 1995). U rýže je vývoj exodermis urychlen při zasolení (Krishnamurthy et al., 2011). Různou odpověď v diferenciaci exodermis také sledují například studie s třemi různými způsoby pěstování rostlin a to v substrátu, hydroponii a aeroponii, přičemž nejvíce odlišná odpověď byla pozorována u rostlin rostoucích v hydroponii, kde exodermis vzniká dále od špičky (Obr. 3) (Meyer et al., 2009;

Redjala et al., 2011). V případě kontaminace substrátu těžkými kovy (Cd, Zn, Cu, atd.) byla opět indukována diferenciací exodermis blíž ke špičce nebo bylo zesíleno ukládání suberinu či ligninu (Cheng et al., 2012; Vaculík et al., 2012). V zaplavovaných oblastech, kde jsou kořeny vystaveny nedostatku kyslíku a přítomnosti toxických redukováných sloučenin v substrátu, je diferenciací exodermis také indukována, neboť zabraňuje ztrátám kyslíku z kořenů a pronikání toxických látek do nitra kořene (Armstrong a Armstrong, 2005; Soukup et al., 2002). Její vznik může dokonce předcházet vzniku endodermis. Tento vzorec diferenciací je u mokřadních rostlin dokonce vlastnost konstitutivní, tj. vyskytující se bez ohledu na aktuální podmínky panující v substrátu (Soukup et al., 2002). Jak pro příjem vody, tak v prevenci její ztráty hraje exodermis rostlin zásadní roli, takže i sucho iniciuje její zakládání (Cruz et al., 1992). Jistý vliv má i dostupnost živin, ale výsledky jsou zatím nejednoznačné. U skočce (*Ricinus communis*) byla pozorována snížená suberinizace hypodermis při deficienci nitrátu (Schreiber et al., 2004). Naopak deficiencie hořčičku v substrátu způsobila u kukuřice (*Zea mays*) zvýšenou akumulaci suberinu v obou apoplastických bariérách (Pozuelo et al., 1984).

2.7. Vliv přítomnosti exodermis na transportní vlastnosti kořene

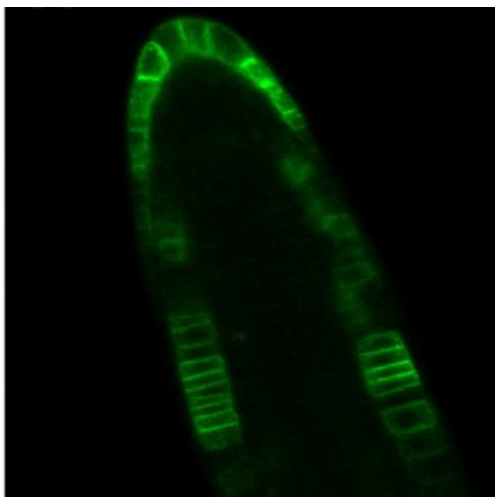
Je-li přítomna exodermis, je příjem látek do symplastu zajištěn pouze buňkami rhizodermis, což je omezující třeba v případě kadmia a solí (Krishnamurthy et al., 2011; Redjala et al., 2011). U rostlin s více diferencovanou exodermis byla pozorována snížená hydraulická vodivost kořenů (zvýšený hydraulický odpor) pro vodu i látky pohybující se apoplastem (Zimmermann a Steudle, 1998). Průchodnost apoplastu kořene je sledována pomocí tzv. apoplastických sond (tracerů), tj. látek pohybujících se přednostně apoplastem, například PTS (trisodium 3-hydroxy-5,8,10-pyrentrisulfonát), Calcofluor, berberine, atd. (Pecková et al., 2016). Díky tomuto pozorování je zřejmé, že se exodermis stává významnou rezistentní bariérou, která podněcuje transport symplastem (Meyer et al., 2011b; Zimmermann et al., 2000; Zimmermann a Steudle, 1998). Přítomnost exodermis je důležitá také v dalších aspektech. Pomocí mikroelektrody byly měřeny ztráty kyslíku u kořenů mokřadních rostlin. Výsledky těchto studií dokládají protektivní vlastnosti exodermis bránící úniku kyslíku (Armstrong a Armstrong, 2005; Soukup et al., 2007). Exodermis nicméně není bariérou absolutní. Např. u rýže byl pozorován nižší hydraulický odpor v exodermis než v endodermis (Kosala Ranathunge, Steudle, a Lafitte 2003). Toto pozorování autoři vysvětlují přítomností míst, která mohou zprostředkovat průtok bariérou. Jsou to např. místa odbočování postranních

kořenů nebo tzv. „oken“- oblastí buněk bez suberinových lamel či CP, které se nachází v oblasti nad prorůstajícími primordií postranních kořenů (Armstrong a Armstrong 2005; Ranathunge, Steudle, a Lafitte 2005; Soukup, Votrubová, a Čížková 2002).

2.8. Lokalizace příjmu živin v kořeni

Příjem živin je zprostředkován či usnadněn pomocí membránových transportérů, jejichž exprese může být ovlivněna například množstvím přítomné živiny (například P, N), druhem rostliny, konkrétními podmínkami atd. Membránové transportéry se pro většinu živin (např. B, P, N) nacházejí na plazmatické membráně buněk od rhizodermis po střední válec. V případě transportu vody pomocí aquaporinů je tomu také tak (Hachez et al., 2006a). U některých těchto transportérů může docházet ke změně lokalizace s diferenciací kořene. Například transportéry bóru u huseničku mizí ve straších částech kořene z rhizodermis a vyskytují se přednostně na plazmalemě buněk endodermis (Alassimone et al., 2010; Takano et al., 2010). Podobně byla u rýže pozorována exprese genů pro transport bóru v mladších částech v buňkách rhizodermis, exodermis i středního válce. S diferenciací kořene později pouze v exodermis (Liu et al., 2015). Transportéry další důležité látky – fosfátu u huseničku byly lokalizovány v buňkách rhizodermis včetně kořenových vlásků. V mladých částech kořene i v primární kůře (Mudge et al., 2002; Nussaume, 2011). Další významnou živinou je dusík, jehož transport probíhá přes velké množství transportérů. Například AtNRT1;1 (*Arabidopsis thaliana* Nitrate Transporters family) je lokalizovaný spíše v radiální části plazmalemy povrchové vrstvy buněk krátkých postranních kořenů (Obr. 4) (Krouk et al., 2010) v blízkosti kořenové špičky, ale s diferenciací kořene se přesouvá do primární kůry a endodermis (Forde, 2000; Huang et al., 1996).

V některých případech lze pozorovat majoritní výskyt transportérů ve vrstvách apoplastických bariér. Například rýže přednostně přijímá amonný ion, a to za pomoci OsAMT1;1 (*Oryza sativa* Ammonium transporter), který je konstitutivně exprimován v endodermis a exodermis. OsAMT1;2 se účastní příjmu i translokace N do cévních svazků a jeho exprese byla pozorována v exodermis, sklerenchymu, endodermis a středním válci ve špičce primárního kořene (Sasaki et al., 2016; Sonoda et al., 2003). Taktéž v případě transportu křemíku u rýže byly transportéry pozorovány na úrovni apoplastických bariér. Avšak v případě kukuřice a ječmene je křemík zřejmě přijímán celou primární kůrou



Obrázek 4: Lokalizace AtNRT1;1 v mladém postranním kořeni huseníčku (Krouk et al., 2010).

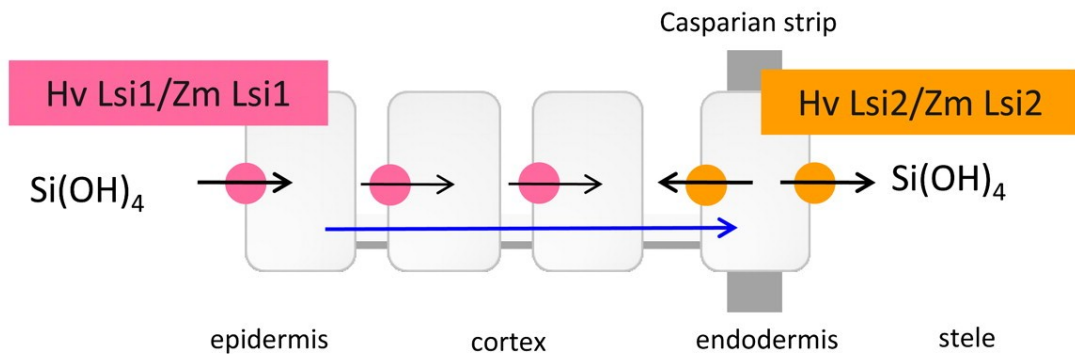
a rhizodermis, což zřejmě koresponduje s celkově nižším požadavkem těchto rostlin na přísun křemíku ve srovnání s rýží (Mitani et al., 2009; Yamaji a Ma, 2007).

V mnohých případech sledujeme také rozdíly v pozici transportéru v rámci plazmatické membrány. Plazmatické membrány buněk rhizodermis a primární kůry jsou polarizované. Mají vnější – distální oblast, která leží blíže k povrchu, a vnitřní – proximální oblast blíže

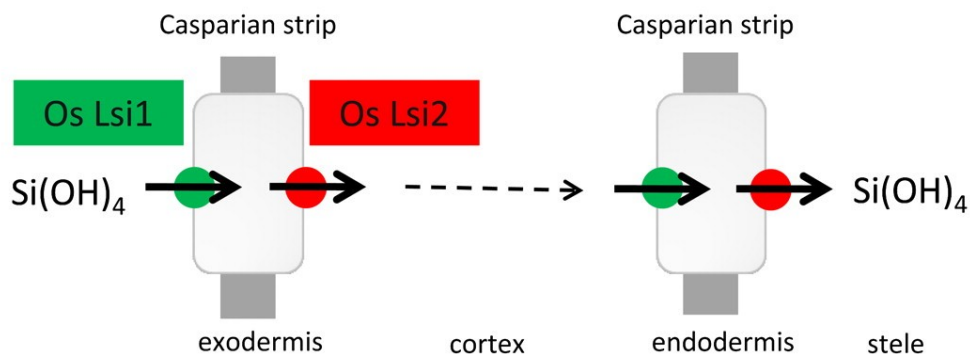
ke střednímu válci. Některé transportéry nalezneme podél obvodu celé buňky, jiné s polarizovaným výskytem pouze na jedné straně. V druhém případě většinou dochází ke spolupráci dvou transportérů, z nichž jeden zajišťuje vstup do buňky a druhý výdej z buňky do apoplastu (Ma et al., 2007; Takano et al., 2010). Právě na úrovni apoplastických bariér často pozorujeme polarizovanou lokalizaci a spolupráci transportérů, avšak nejen v těchto vrstvách byla polarizovaná lokalizace pozorována. Prvním objeveným polarizovaně lokalizovaným transportérem byl StPT2 (*Solanum tuberosum* Phosphate transporter) bramboru, jehož lokalizace byla popsána v distální části plazmalemy buněk rhizodermis (Gordon-Weeks, 2003). Tatáž lokalizace byla pozorována u AtAMT1;1 (*Arabidopsis thaliana* Ammonium transporter) sloužící transportu amonného iontu u huseníčku (Neuhäuser et al., 2007). Polarizovaně lokalizované transportéry nalezneme také v případě transportu bóru, kdy AtNIP5;1 (*Arabidopsis thaliana* Nodulin26-like major Intrinsic Proteins) je lokalizovaný na distální straně plazmalemy buněk rhizodermis a ve starších částech kořene v endodermis (Alassimone et al., 2010; Takano et al., 2010). Tento transportér je doplněn AtBOR1 (*Arabidopsis thaliana* Boron efflux carrier), který leží na proximální straně plazmalemy buněk rhizodermis mladších částí kořenů nebo endodermis ve starších částech. Spolupráci dvou transportérů můžeme také pozorovat u již zmíněné rýže a transportu křemíku, kdy je OsLsi1 (*Oryza sativa* Low silicon rice) lokalizován na distální straně plazmatické membrány buněk exodermis i endodermis a slouží tak pro příjem křemíku. Výdej křemíku z buňky je zajištěn OsLsi2 lokalizovaným na proximálních stranách buněk apoplastických bariér, zatímco u ječmene a kukuřice se Lsi2 nachází také v endodermis, avšak bez polarizované lokalizace (Ma a Yamaji, 2015)(Obr. 5). Polarizovanou lokalizaci u rýže na exodermis a endodermis

vykazuje i transportér manganu a kadmia Nramp5 (Natural resistance associated Macrophage protein 5) (Sasaki et al., 2012). Také u transportérů železa a hořčíku byla pozorována polarizovaná lokalizace (Barberon et al., 2014).

Maize and Barley



Rice



Obrázek 5: Schématické znázornění příjmu křemíku u rýže (*Oryza sativa*), kukuřice (*Zea mays*) a ječmene (*Hordeum vulgare*) (Mitani et al., 2009), Lsi1 – transportér křemíku do buňky, Lsi2 – transportér křemíku ven z buňky.

2.9. Vliv přítomnosti exodermis na lokalizaci membránových transportérů v kořeni

Příjem látek z apoplastu do symplastu je omezen snížením počtu buněk a povrchu membrán, které se na něm jinak podílejí (Enstone et al., 2003). Pokud má exodermis výrazný vliv na radiální pohyb látek apoplastem, lze předpokládat v závislosti na míře její diferenciace změnu v distribuci transportérů na membránách rhizodermis a primární kůry. Této problematice se doposud nevěnovalo mnoho pozornosti. Jednou z mála výjimek je studie lokalizace

aquaporinů, ve které autoři pozorovali zvýšení exprese některých genů kódujících aquaporiny v korelaci s diferenciací kořene. Navíc pozorovali zvýšenou přítomnost některých aquaporinů v buňkách exodermis a rhizodermis, v těch částech kořene, kde již byla exodermis diferencovaná (Hachez et al., 2006b). Obecně byla exprese zvýšená v elongační a maturační zóně oproti kořenové čepičce, kde byl exprimován pouze *ZmPIP2;4* (*Zea mays* plasma membrane intrinsic protein). Nejvýraznější nárůst exprese ve starších částech kořene byl pozorován u *ZmPIP1;5* a *ZmPIP2;5*. *ZmPIP2;5* byl lokalizován v exodermis, endodermis a distální straně buněk rhizodermis.

3. Metodika

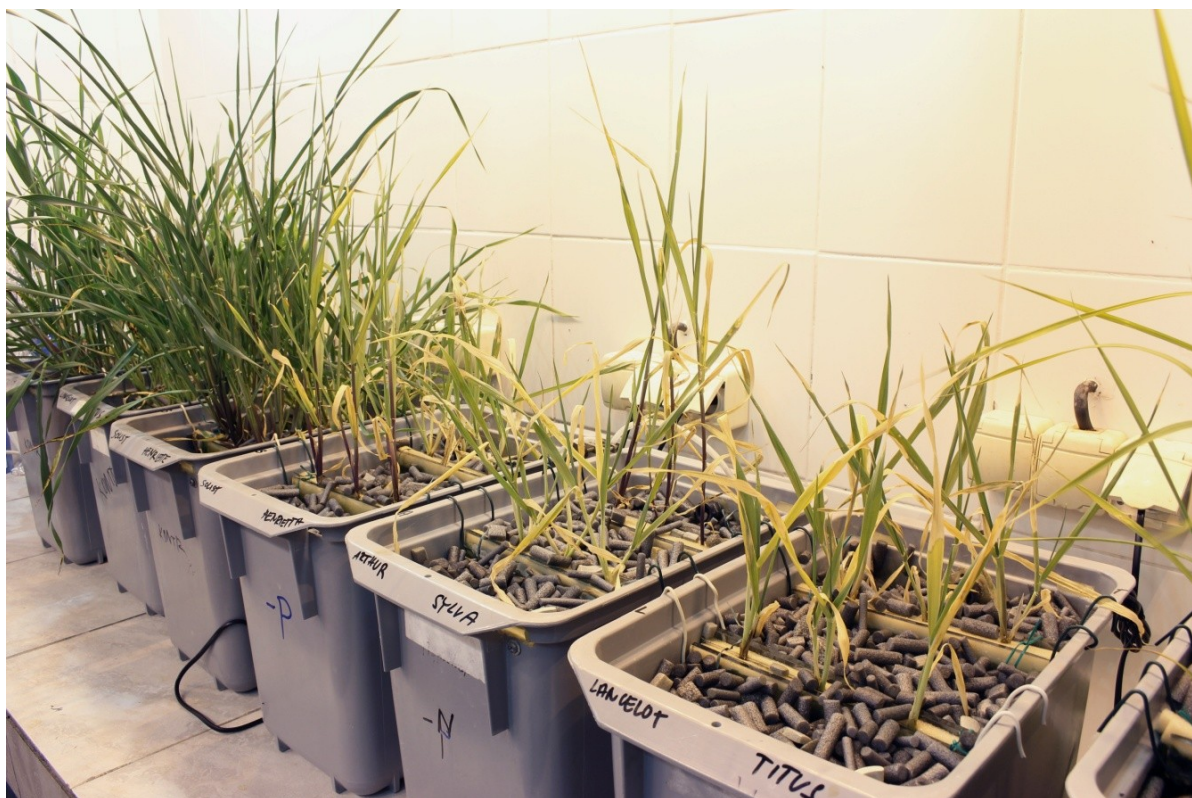
3.1. Vliv nedostatku fosforu (P) na růst a diferenciaci apoplastických bariér u 6 kultivarů ječmene *Hordeum vulgare* (Experiment 1)

Tento experiment byl realizován za účelem zmapování rozsahu diferenciacie exodermis u vybraných kultivarů ječmene v kontrolních podmínkách a při deficienci P. Cílem bylo analyzovat vliv deficiencie P na rozsah tvorby exodermis a také nalezení vhodného kultivaru pro následnou analýzu lokalizace membránových vysokoafinitních transportérů fosfátu.

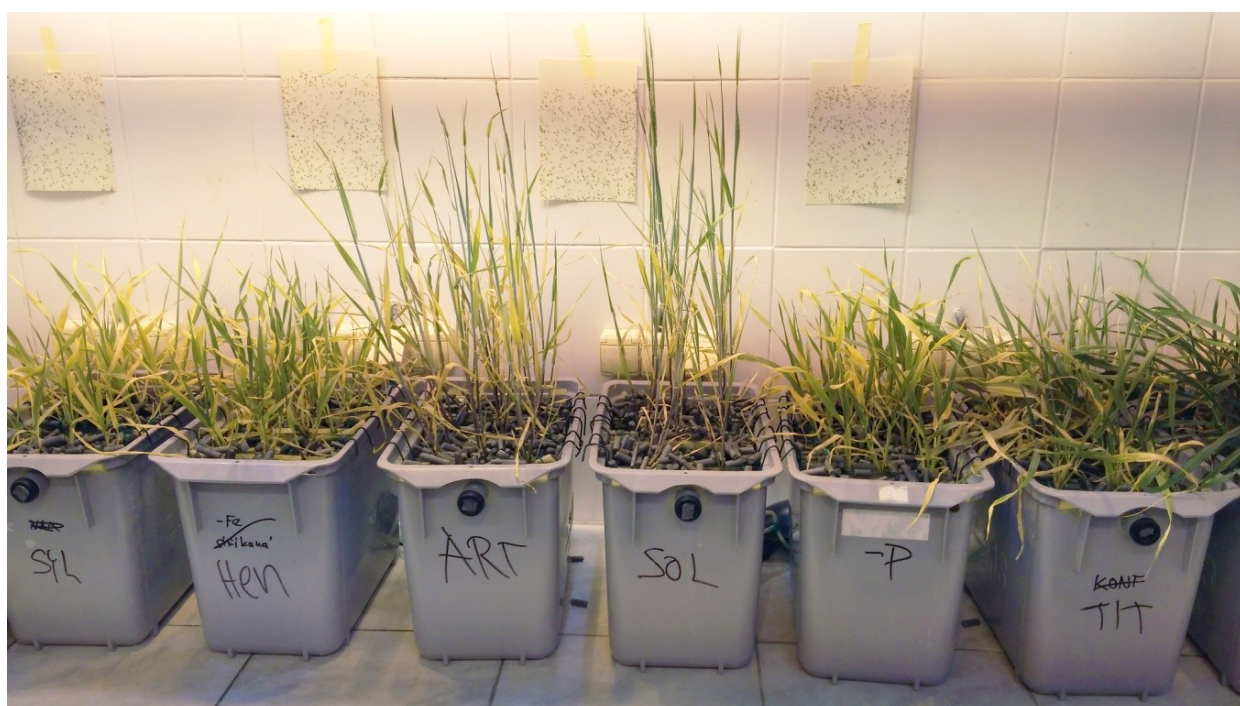
3.1.1. Pěstování rostlin

Semena 6 kultivarů ječmene (*Hordeum vulgare*), konkrétně čtyři ozimé: Henriette, Lancelot, Titus, Sylva a dva jarní: Arthur, Solist (zdroj: Odbor osiva a sadby ÚKZÚZ, <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal>) byla nejprve naklíčena 2 dny na vlhké papírové utěrce při pokojové teplotě ve tmě. Následně byly naklíčené rostliny přesazeny do Hoaglandova roztoku (Hoagland a Arnon, 1950) zředěného na $\frac{1}{4}$ s přidavkem mikroprvků (Laštůvka a Minář, 1967) s obsahem těchto prvků (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 týdnu byla polovina rostlin přenesena do roztoku deficientního na fosfát (složení roztoku zůstalo stejné jako během prvního týdne kultivace, pouze obsah PO_4^{3-} byl snížen na $0\mu\text{M}$ a obsah K^+ byl dorovnan na hodnotu odpovídající $\frac{1}{4}$ Hoaglandu přidáním K_2SO_4) – **P deficientní varianta**. Druhá polovina rostlin zůstala v roztoku o kompletním složení živin – **kontrolní varianta**.

Vždy po 7 dnech byl roztok vyměněn za čerstvý. Pro hydroponické pěstování byly použity 12 litrové plastové nádoby, do nichž bylo vloženo 6 naklíčených semen upevněných pomocí skleněných lišt a molitanu (Obr. 6) - 2 kultivary sdílely jednu kultivační nádobu (Solist + Henriette, Arthur + Sylva, Lancelot + Titus). Celkem tedy byly pěstovány od každého kultivaru 3 rostliny v kontrolní a 3 v P deficientní variantě). Pro zabránění průniku světla ke kořenům a omezení tvorby řas byla hladina kultivačního roztoku pokryta kusy polyuretanu, pro dostatek kyslíku bylo zavedeno provzdušňovací zařízení (s akvaristickým motorkem). Rostliny rostly za konstantních podmínek: 16/8 h světlo/tma (ozáření $435 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$), 22/18°C denní/noční termoperioda a relativní vlhkost vzduchu dosahovala 50 - 75%. Kultivace trvala celkem 35 dnů.



Obrázek 6: Kultivace 6 kultivarů ječmene – kontrolní a deficiční varianta v době odběru rostlin (po 35 dnech).



Obrázek 7: Kultivace kultivarů – P deficiční varianta v době odběru rostlin (po 35 dnech).

3.1.2. Analýza kvantitativních fenotypových znaků

5 týdnů staré rostliny byly sklizeny a podrobeny měření. Byla změřena délka celého kořenového systému (po špičku nejdelšího kořene) a délka prýtu (po nejdelší list). Kořeny a prýty byly odděleny a zabaleny do zvážených alobalových čtverců, ve kterých byly na 1 týden uloženy do sušárny o teplotě 65°C. Poté byla změřena celková hmotnost alobalových balíčků a odečtena váha alobalu, čímž jsme získali hmotnost sušiny. Vždy byl také odebrán jeden kořen z každé rostliny do fixačního roztoku (4% formaldehyd v destilované vodě) pro následnou detekci apoplastických bariér. Při odběru byla snaha vybrat kořeny živé, stejně staré, dobře rostoucí, ne však nejdelší.

3.1.3. Anatomická analýza kořenů

Detekce apoplastických bariér

Fixované kořeny byly nejprve změřeny (celková délka a délka nevětvené apikální části). Anatomická stavba kořene byla analyzována ve $\frac{3}{4}$ a $\frac{1}{2}$ délky kořene od špičky. Z dané pozice byl vždy odebrán centimetrový segment, ze kterého byly pomocí ručního mikrotomu připraveny tenké řezy (100 μm).

Histochemickým barvením těchto řezů byly detekovány apoplastické bariéry. Aplikací berberinu (0,1% aq.) po dobu 1 hodiny, omytí vodou a následně dobarvením 10 minut genciánovou violetí (0,05% aq.) byly vizualizovány lignifikované Casparyho proužky. Barvením 1 hodinu Sudanem Red7B a oplachem 1% SDS (sodiumdodecylsulfát) byly lokalizovány suberinové lamely. Řezy byly vždy na závěr opláchnuty vodou, do preparátu montovány pomocí 65% glycerolu a pozorovány mikroskopem Olympus BX51 s filtrem UV Olympus U-MWU a snímány digitální kamerou Apogee U4000.

3.1.4. Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování bylo provedeno v programu NCSS 9 verze 9.0.15 (Hintze, J. 2013 NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; www.ncss.com). Vliv varianty kultivace a kultivaru byl analyzován s pomocí analýzy variance (GLM ANOVA, Bonferroni test).

3.2. Detailní analýza růstu kultivarů ječmene v P deficientních podmínkách (Experiment 2)

Druhý pokus s kultivary probíhal totožně jako v prvním případě (naklíčení semen, předpěstování rostlin). Rozdílem bylo, že každý kultivar měl vlastní kultivační nádobu, do které bylo na 3 skleněné lišty vysazeno 9 rostlin (Obr. 7). Po předpěstování v kontrolní variantě ($1/4$ Hoaglandu, viz výše) po dobu jednoho týdne byl kultivační roztok u všech rostlin vyměněn za P deficientní roztok. Kontrolní varianta nebyla pěstována. Cílem tohoto experimentu bylo ověřit s větším počtem rostlin výsledky Experimentu 1, ve kterém jednotlivé kultivary vykazovaly rozdílné růstové parametry v podmínkách nedostatku P (rozdílnou produkci biomasy, délku kořenového systému, rozsah tvorby bariér). Tudíž i v tomto případě, stejně jako v předchozím experimentu bylo provedeno měření délky prýtu, kořenového systému, hmotnosti sušiny nadzemní i podzemní části rostlin a celkové biomasy, viz Experiment 1. Anatomická analýza kořenů (stav diferenciacce bariér) byla v tomto případě provedena pouze u dvou kultivarů (Sylva, Lancelot) v $1/2$ délky kořene.

Statistické zpracování bylo provedeno taktéž v programu NCSS 9 verze 9.0.15 (Hintze, J. 2013 NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; www.ncss.com). Srovnání kultivarů v jedné variantě kultivace bylo provedeno pomocí analýzy variance jednoduchého třídění (One-way ANOVA).

3.3. Lokalizace vysokoafinitních membránových transportérů fosfátu u ječmene *Hordeum vulgare* pomocí protilátky HvPht1;1,2

Na základě Experimentu 1 byl vybrán modelový kultivar pro tento experiment, jehož cílem bylo detekovat lokalizaci vysokoafinitních transportérů fosfátu (Pht1;1 a Pht1;2) u ječmene. K vizualizaci výskytu těchto transportérů byla použita metoda imunodetekce pomocí protilátky Anti – HvPht1;1, 2 (Agrisera, Švédsko, kat. č. protilátky AS08 321), která se váže specificky k těmto dvěma isoformám kořenových transportérů (mají vysokou sekvenční podobnost). Dalším cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda dochází ke změně lokalizace těchto transportérů v různě starých částech kořene v korelaci s postupem diferenciacce exodermis.

3.3.1. Experiment 3 – rostliny pěstované v 0 μ M P

Vybraný kultivar ječmene (*Hordeum vulgare* cv. Henriette) byl pěstován za stejných podmínek jako ječmen v předchozím experimentu (viz. Experiment 1), pouze s rozdílem délky trvání kultivace a to 3 týdny. Po týdnu kultivace v kontrolním roztoku byla část rostlin přenesena do roztoku deficientního na fosfor, kde rostla 14 dní.

3.3.2. Anatomická analýza kořenů

U 3 týdnů starých rostlin byly odebrány kořeny průměrné délky. Odebrané kořeny byly převedeny na 2 hodiny do fixačního roztoku (4% formaldehyd ve fosfátovém pufru, pH – 7,4), během kterých byly pomocí vývěvy odvdušněny (cca 30 minut). Fosfátový pufr byl připraven smícháním 19 ml 0,2M kyselého dihydrogenfosforečnanu sodného s 81 ml 0,2M hydrogenfosforečnanu sodného a doplněn destilovanou H₂O do 200 ml. Z odvdušněných kořenů byly pomocí ručního mikrotomu připraveny řezy (100 μ m) v různých pozicích na podélné ose kořene – $\frac{1}{12}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ celkové délky kořene ve směru od špičky. Tyto řezy byly sbírány kapátkem současně do 4 košíčků od každé pozice, aby bylo možné v daném místě kořene provést zároveň histochemickou detekci apoplastických bariér i imunodetekci fosfátových transportérů.

3.3.2.1. Detekce apoplastických bariér

Detekce Casparyho proužků a suberinových lamel v exodermis i endodermis byla na řezech provedena totožným postupem jako v předchozím experimentu (viz Experiment 1 – Anatomická analýza kořenů).

3.3.3. Imunodetekce fosfátových transportérů pomocí protilátky Anti – HvPht1-1, 2

Imunodetekce i příprava potřebných chemikálií byla provedena postupem optimalizovaným podle (Soukup, 2014). Složení použitých chemikálií je znázorněno v tabulce 1.

Připravené řezy byly opláchnuty v 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) po dobu 2 x 5 minut. Následovala aplikace 1,5% kaseinu na 15 minut, opět oplach v 1x PBS 5 minut a aplikace primární protilátky. Primární protilátka byla použita v ředění 1:100 (po předchozím testování různých koncentrací se toto ředění jevílo jako neoptimálnější). Této

koncentrace bylo dosaženo naředěním alikvoty primární protilátky pomocí 1x PBS a přidáním BSA (Bovine Serum Albumin; 10 μ l zásobního roztoku BSA (100 mg BSA/ml 1x PBS) na 1 ml roztoku). Část řezů sloužila jako negativní kontrola – jeden košíček s řezy byl umístěn do roztoku bez primární protilátky (pouze 1x PBS s přidavkem BSA ve stejné koncentraci) pro kontrolu nespecifické vazby sekundární protilátky. Po dvou hodinách působení primární protilátky (uzavřeno ve vlhké komůrce – Petriho miska s navlhčenou papírovou utěrkou; při pokojové teplotě) byly řezy dvakrát propláchnuty v 1x PBS po dobu 10 minut a byla aplikována sekundární protilátka (Goat anti – rabbit IgG (H&L) DyLight™ 488 Conjugate Agrisera, kat. č. AS09 633,) která působila také 2 hodiny při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Sekundární protilátka byla použita v ředění 1:1000, která vznikla naředěním stocku sekundární protilátky pomocí 1x PBS a přidáním 10 μ l zásobního roztoku BSA (100 mg BSA/ml 1x PBS) na 1 ml finálního roztoku. Působení primární i sekundární protilátky lze prodloužit přes noc uložením vlhké komůrky do lednice. Po odsátí sekundární protilátky byly řezy promyty 1x PBS 5 minut a obarveny genciánovou violetí. Tato metoda byla optimalizována pro daný experiment, a to finálním působením genciánové violeti (0,05% aq.) po dobu 3 minut, namísto obvykle používané toluidinové modři, která se pro tento experiment nejevila jako optimální (při použití toluidinové modři byla autofluorescence buněčných stěn velmi podobná signálu protilátky a bylo obtížné ji odlišit). Hotové řezy byly uzavřeny do glycerolu s propylgalátem.

Signál protilátky byl dále snímán na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 (Laboratoř konfokální a fluorescenční mikroskopie Přf UK) a také ověřován metodou FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy; Biocev – Leica TCS SP8 WLL SMD-FLIM), která umožňuje částečně odlišit světelný signál sekundární protilátky od autofluorescence buněčných stěn na základě rozdílných životností fluorescence.

chemikálie	složení
10x PBS	80,1 g NaCl, 2 g KCl, 14,7 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O a 2,38 g KH ₂ PO ₄ doplnit do 1 l destilovanou H ₂ O, pH 6,8
1x PBS	Smíchat 100 ml 10x PBS a 900 ml H ₂ O, pH 7,3
10% BSA	1 g práškového BSA (Frakce V) rozpustit v 10 ml destilované H ₂ O
3x kasein	3,33% (w/v) kaseinu rozpustit v destilované H ₂ O, titrovat pomocí 2M KOH na pH 10, míchat cca 2 h při 40°C. Poté pomocí 2M HCl dosáhnout pH 7

1,5% kasein	3x kasein naředit 10x PBS
Propyl galát	3% (w/v) n-propyl galátu rozmíchat přes noc při pokojové teplotě v glycerolu. Poté smíchat v poměru 8:2 s TRIS pufr (0,1 M, pH 9,0)
TRIS pufr (0,1 M, pH 9,0)	Rozpustit 12,1 g TRIS báze v 750 ml destilované H ₂ O. Titrovat 1M HC lna pH 9,0, doplnit destilovanou H ₂ O do 1 l finálního roztoku

Tabulka 1: Příprava chemikálií potřebných pro práci s protilátkami. Upraveno podle Soukup 2014

3.3.4. Experiment 4 – rostliny pěstované v 10 μ M P

Tento experiment se lišil od předchozího Experimentu 3 ve způsobu, jakým byla navozena deficiencie P. Rostliny byly v tomto případě pěstovány v kontrolní či deficientní variantě hned od začátku kultivace (po naklíčení). Tato deficientní varianta však obsahovala 10 μ M P. Cílem bylo zjistit, zda přítomnost nízké koncentrace fosfátu po celou dobu kultivace dokáže u rostlin vyvolat odlišnou reakci na deficienci fosfátu, než je tomu u rostliny z roztoku, který neobsahuje žádný fosfát.

3.3.5. Pěstování rostlin

Semena kultivaru ječmene – Henriette, byla vložena a uzavřena v Petriho misce na vlhké papírové utěrce s filtračním papírem přes noc do lednice. Následující den byla přenesena do skříně (tma a pokojová teplota), kde klíčila 3 dny. Poté byla 4 naklíčená semena uchycena do polyuretanového plováčku a přenesena do kontrolního $\frac{1}{4}$ Hoaglandova roztoku (viz Experiment 1) a další 4 semena do roztoku deficientního na fosfát (10 μ M). Obsah K⁺ byl dorovnán na hodnotu odpovídající $\frac{1}{4}$ Hoaglandu přidáním K₂SO₄ (viz. Experiment 1). Po týdnu byl roztok vyměněn za čerstvý a počet rostlin zredukován na 2 od každé varianty za účelem vytvoření co nejoptimálnějších kultivačních podmínek. Po dalším týdnu byly roztoky opět vyměněny za čerstvé. Hydroponická kultivace trvala celkem 3 týdny.

3.3.6. Histochemické barvení a imunodetekce

Na třech nejdelších kořenech byly aplikovány totožné postupy jako v případě Experimentu 3, tedy histochemické barvení apoplastických bariér a imunodetekce pomocí protilátky Anti – HvPht1;1, 2.

3.3.7. Plazmolýza

U tohoto experimentu bylo navíc využito plazmolýzy pro zjištění stupně diferenciaci exodermis (existence adheze plazmatické membrány k buněčné stěně v místě Casparyho proužku). Z kořenů byly odebrány centimetrové segmenty ve stejných pozicích, jako v předešlých experimentech tj. $\frac{1}{12}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ délky kořene od špičky. Tyto segmenty byly fixovány ve formaldehydu s přidavkem vápenatých iontů - 4,2 g CaCl_2 bylo rozpuštěno v 250 ml destilované vody (0,15M). Z tohoto roztoku bylo odebráno 223 ml, které byly smíchány s 27 ml 36 – 38% formaldehydu. pH tohoto fixačního roztoku bylo pomocí HCl a KOH (2M) srovnáno na 7,3. Následně byly ze segmentů pomocí mikrotomu vytvořeny řezy (100 a 150 μm), které byly barveny 4,2 μl FM4-64 + 345,8 μl 1x PBS po dobu 15 minut, čímž byla vizualizována plazmatická membrána. Samotná plazmolýza byla způsobena montováním řezů na sklíčko do 1M roztoku sacharózy a vody. Celý postup byl proveden dle Vašková 2007 (Vašková, 2007).

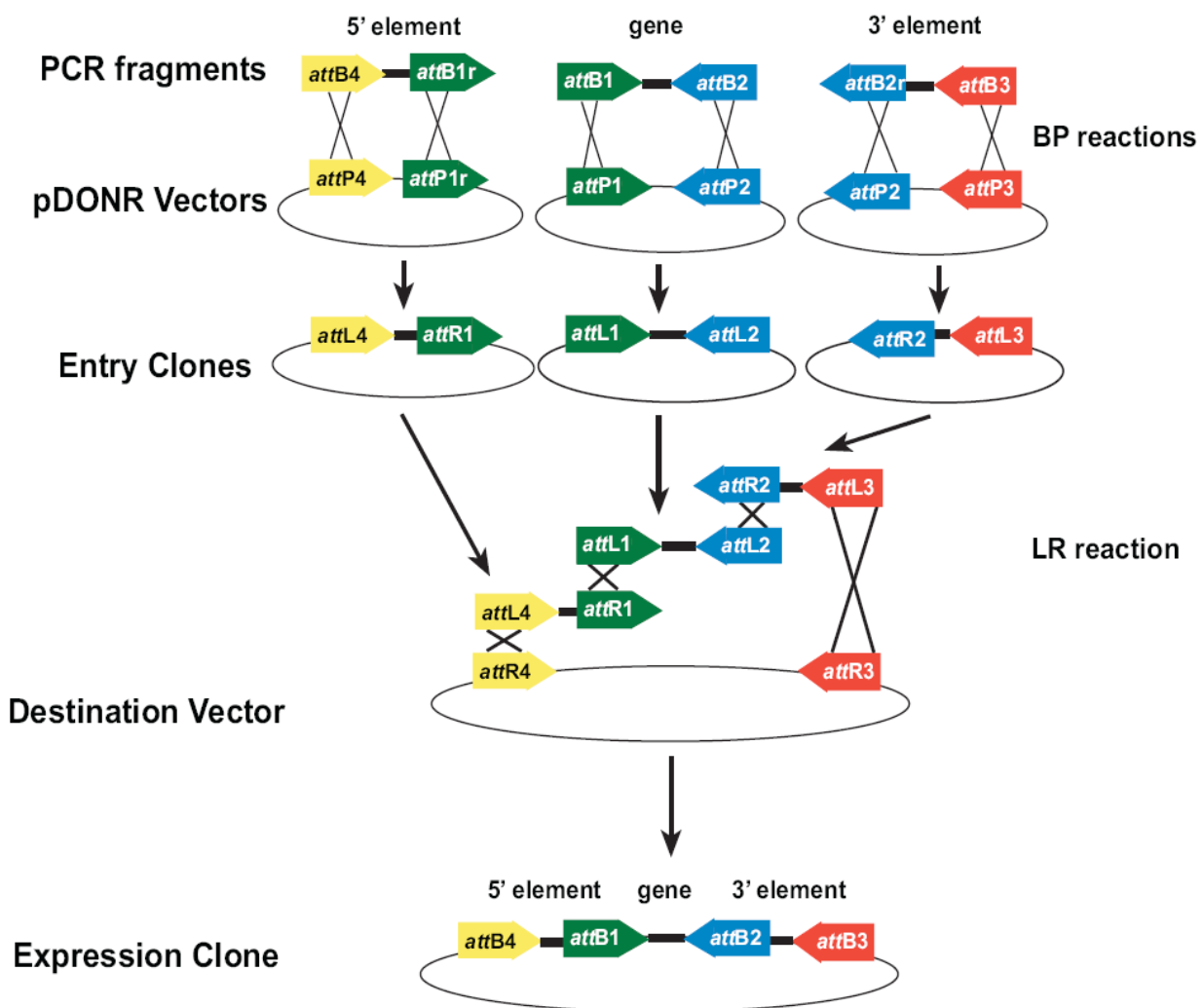
3.4. Příprava rýže (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) nesoucí translační fúzi transportéru křemíku Lsi1 s GFP

Získ transformované rostliny s transportéry viditelnými ve fluorescenčním mikroskopu by velice usnadnila možnost sledovat změnu lokalizace těchto transportérů v korelaci s postupem diferenciaci kořene a apoplastických bariér, konkrétně s postupem ukládání suberinové lamely v exodermis i endodermis. Tento experiment zároveň představoval významný metodický úkol, kterým bylo zavedení a optimalizace metodiky transformace rýže. Neboť příprava transformované rostliny by náročností a rozsahem mohla být sama obsahem další diplomové práce.

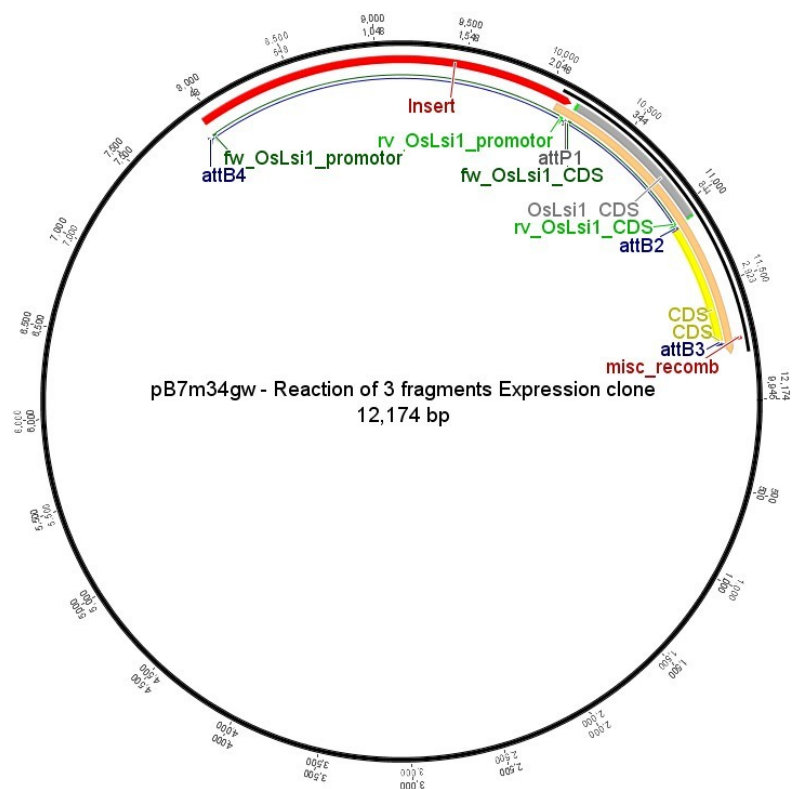
3.4.1. Design klonování

Pro klonování byla využita metoda MultiSite Gateway (Invitrogen) dle schématu viz Obr. 8. Prvním krokem tohoto experimentu bylo zjištění kódu proteinu pro cílovou sekvenci, tedy transportéru křemíku OsLsi1: **Q6Z2T3**. Tento kód byl získán pomocí webové stránky: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6Z2T3>. Na další webové adrese <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6Z2T3.fasta> byla zjištěna sekvence aminokyselin tohoto proteinu. Na stránce <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/90855459?report=fasta> byla

získána sekvence mRNA - **AB222272**, jež odpovídá cDNA z článku Ma a spoluautorů, který se genem *Lsi1* a příjmem křemíku u rýže zabývá (Ma et al., 2006). Dle topologie proteinu byla zvolena C – terminální fúze s GFP. Primery pro amplifikaci promotoru i kódující sekvence *OsLsi1* byly připraveny pomocí programu Geneious 8.1.9. Ve stejném programu byl také připraven celý design klonování až po výsledný expresní vektor (Obr. 9). Pro klonování byly použity vektory uvedené v tabulka 2. Z důvodu obtížné amplifikace promotorové sekvence bylo využito také TA klonování do vektoru pENTR 5'-TOPO (Invitrogen), pro které není nutné, aby primery pro amplifikaci měly adaptorovou sekvenci (přehled primerů viz dále v kapitole 3.4.4. PCR – amplifikace *OsLsi1*).



Obrázek 8: Schéma reakcí MultiSite Gateway (obrázek převzatý z <http://www.biofeng.com/zaiti/Gateway/pDONR-P4P1R.html>).



Obrázek 9: Expresní vektor s vyznačenými sekvencemi. Insert (červeně) – promotorová sekvence *OsLsi1*, *OsLsi1* CDS (šedě) – kódující sekvence *OsLsi1*, CDS (žlutě) – sekvence pro GFP; okrově je vyznačen otevřený čtecí rámec (připraveno pomocí Geneious 8.1.9).

Vektory	
Pro kódující sekvenci	pDONOR221
Pro promotor	pDONOR P4P1r nebo pENTR 5'-TOPO
Destinační vektor	pB7m34gwa
Vektor s GFP pro C-terminální fúzi	pEN-R2-GFP-L3,0

Tabulka 2: Seznam použitých vektorů pro MultiSite Gateway

3.4.2. Izolace genomové DNA z kořenů rýže *Oryza sativa* cv. Nipponbare pomocí CTAB

Aby bylo možné amplifikovat vybrané sekvence (promotor a kódující sekvenci *OsLsi1*), bylo nejprve třeba získat genomovou DNA. Pro izolaci byly použity rostliny rýže *Oryza sativa* cv. Nipponbare kultivované v ¼ Hoaglandu (viz kapitola 3.1.1. Pěstování rostlin) v kultivační místnosti. Pětcentrimetrové segmenty kořenových špiček (5 ks) byly vloženy do 2 ml zkumavky se zámečkem proti otevření společně se 2 nerezovými kuličkami a poté do

kapalného dusíku. Následující homogenizace probíhala 30 s při 25 kmitech/s. Poté bylo přidáno 500 μ l 2x CTAB (cetrimoniumbromid; složení viz tabulka 2). Pomocí magnetu byly vyjmuty nerezové kuličky a zkumavka se nechala inkubovat 15 min při 65°C a 300 kmitech/min ve vodní lázni. K vychladlým vzorkům bylo přidáno 1000 μ l chloroform:izoamylalkoholu (24 : 1) a 2x bylo opakovaně promícháno překlápěním v ruce. Následovalo odstředění 5 min při 14 000 otáček/min. Horní vodní fáze byla odsáta pipetou a přenesena do čisté zkumavky, kam bylo přidáno 1 000 μ l čistého 96% etanolu. Opět bylo promícháno překlápěním v ruce po dobu cca 2 min. Pro lepší vysrážení byla zkumavka vložena na 15 minut do lednice. Následně byla směs odstředěna 5 min při 14 000 otáček/min do vytvoření pelety DNA. Vzniklý supernatant byl pomocí pipety odstraněn. Peleta DNA byla promyta 1 000 μ l 70% čistého etanolu a odstředěna 10 min při 14 000 otáček/min. Etanol byl poté odstraněn a otevřená zkumavka se nechala cca 2 min při 37°C vysušit. Následovalo přidání 36 μ l sterilní H₂O, 4 μ l 10x TE pufru (viz tabulka 3) a peleta DNA se nechala rozpouštět na třepačce při 37°C a 300 kmitech/min po dobu cca 30 min.

2x CTAB (200 ml):	
TRIS (trizma hydrochlorid) 100mM (pH 8)	2,40 g
CTAB 2%	4,00 g
EDTA 20mM	1,42 g
NaCl 1,4 M	16,40 g
PVP (polyvinylpyrrolidon 40) 2%	4,00 g

Tabulka 3: Složení směsi 2x CTAB pro izolaci genomové DNA

10x TE pufr	
1M TRIS	1,0 ml
0,5M EDTA	0,2 ml
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 100 ml

Tabulka 4: Složení TE pufru

TE pufr je třeba sterilizovat.

3.4.3. Izolace mRNA z rýže *Oryza sativa* cv. Nipponbare a příprava cDNA

Izolace mRNA byla provedena za účelem amplifikace kódující sekvence *OsLsi1* bez intronů. K izolaci RNA byly použity rostliny rýže dlouhodobě kultivované za stejných podmínek jako pro izolaci DNA (viz kapitola 3.1.1.).

K izolaci mRNA byl použit Macherey – Nagelkit a bylo postupováno dle návodu výrobce. Koncentrace získané mRNA byla změřena pomocí NanoDropu (ThermoScientific). Příprava cDNA proběhla metodou RT – PCR. PCR (PCR spojená s reverzní transkripcí; reverse transcription polymerase chain reaction).

Pro RT – PCR byla získaná mRNA nejprve zbavena kontaminující DNA její hydrolýzou pomocí DNazy dle následujícího postupu: 1 µg mRNA byl doplněn sterilní H₂O do objemu 7,5 µl a následně smíchán s premixem (viz tabulka 5). 200 µl zkumavka se směsí byla po dobu 30 minut inkubována při teplotě 37°C. Poté byl přidán 1 µl 25mM EDTA. Hydrolýza byla ukončena zahřátím na 65°C po dobu 10 minut. Výsledný produkt (čistá mRNA) byl použit do RT – PCR. Díky reverzní transkripci byla z mRNA získána cDNA pomocí reakce dle tabulky 6. Reakční směs byla 1 hodinu inkubována při 42°C a 10 minut při 70°C. Pro tuto reakci byl použit RevertAid H Minus First Stra cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™).

Premix (2,5 µl):	
10x reakční pufr	1 µl
RNAse inhibitor	0,5 µl
DNase	1 µl

Tabulka 5: Složení premixu pro hydrolýzu DNA

Složení reakce (20 µl):	
mRNA	5,0 µl
H ₂ O	6,5 µl
Primer oligo dT	1,0 µl
Premix (7,5 µl):	
5x reakční pufr	4,0 µl
RiboLockRnase Inhibitor	0,5 µl

dNTP mix, 10mM	2,0 µl
RevertAid H Minus Transkriptáza	1,0 µl

Tabulka 6: Složení reakční směsi RT – PCR

3.4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR) – amplifikace *OsLsi1*

Polymerázová řetězová reakce byla použita pro amplifikaci kódující sekvence *OsLsi1* (cca 900 bp) genu z komplementární DNA (cDNA) nebo genomové DNA (gDNA) a pro amplifikaci promotorové sekvence z gDNA (2500 bp). Polymerázou těchto reakcí byla termostabilní Dream Taq DNA dependentní polymeráza nebo polymeráza Q5, v závislosti na použitých primerech (dle přítomnosti adaptorových sekvencí). Dream Taq polymeráza byla použita v případě plánovaného klonování získané sekvence do pENTR 5'-TOPO vektoru, Q5 polymeráza pro klonování do pDONOR 221 a pDONOR P4P1r. Bylo vyzkoušeno několik různých primerů (viz tabulka 7) s různou sekvencí a teplotou nasedání, která je odvozena od jejich teploty tání (T_m). Konkrétní hodnota byla zjištěna dle T_m kalkulátoru na webových stránkách firmy ThermoScientific (<https://www.thermofisher.com>). Teplota nasedání se od T_m liší o 3–6°C. Práce s reakcemi (viz tabulka 8) probíhaly na ledu, v celkovém objemu 20 µl ve 200 µl zkumavkách. Časové schéma a použité teploty udává tabulka 9.

Primery s adaptorovou sekvencí byly zkráceny pro T_m (temperature melting) kolem 60°C dle NEB T_m calculator (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) pro použití Q5 polymerázy. Byly také připraveny primery pro Dream Taq polymerázu, které se nezkracovaly.

Primery	
Amplifikace kódující sekvence <i>OsLsi1</i> pro klonování do pDONOR 221	
forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA ATGGCCAGCAACAAC (červeně označena adaptorová sekvence attB1)
reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA CACTTGGATGTTCTCCAT C (červeně označena adaptorová sekvence attB2)
Amplifikace promotoru <i>OsLsi1</i> pro klonování do pDONOR P4P1r	
forward	GGGGACA ACTTTGTATAGAAAAGTTGGGTGGAGTGCTCATTACAGAA GGCA (červeně označena adaptorová sekvence attB4)

reverse	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCTTCTGACGCTCTATCTAGC (červeně označena adaptorová sekvence attB1r)
Amplifikace promotoru OsLsi1 pro klonování do pENTR 5'-TOPO	
forward	TCTCTGTTTGCACATGTG (fw) CTGAGGAGCGCAGACAAAAG (fw1) GGTTCTAAACGTGCCCCAGA (fw2) GTCTCATCTCAGGCAGCACA (fw3)
reverse	TTCTGACGCTCTATCTAGC TTCTGACGCTCTATCTAGCTGA

Tabulka 7: Přehled otestovaných primerů pro amplifikaci kódující sekvence a promotoru

Premix (20 µl):	DreamTaq polymeráza	Q5 polymeráza
DNA	1,0 µl	1,0 µl
dH ₂ O	10,56 µl	9,35 µl
Pufř	2,0 µl (10x DreamTaq pufř)	4,0 µl (5x Q5 pufř)
Betain	4,0 µl	4,0 µl
Přímý primer (forward)	1,0 µl	0,5 µl
Zpětný primer (reverse)	1,0 µl	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl	0,4 µl
Polymeráza (5U/µl)	0,04 µl	0,25 µl

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro Dream Tag a Q5 polymerázu

Program	DreamTaq polymeráza			Q5 polymeráza		
	Teplota	Čas (min)	Opakování	Teplota	Čas (min)	Opakování
Počáteční denaturace	94°C	0:30	1x	98°C	0:30	1x
Denaturace	94°C	0:15	30x	98°C	0:15	35x
Nasednutí primerů	48°C	1:00	30x	54°C	1:00	35x
Polymerace	72°C	2:30	30x	72°C	2:30	35x
Dosyntetizování	72°C	2:00	1x	72°C	2:00	1x
Ukončení	4°C	∞		4°C	∞	1x

Tabulka 9: Časové a teplotní schéma PCR – DreamTaq a Q5 polymerázy

3.4.5. Agarózová gelová elektroforéza

Pro ověření úspěšnosti amplifikace byla provedena agarózová gelová elektroforéza. Na základě stejnosměrného elektrického proudu umožňuje tato metoda oddělit makromolekuly různé velikosti a náboje. Pohyb DNA probíhá v agarózovém gelu - 1,2 g agaróza, 100 ml 0,5x TAE pufru (složení viz tabulka 10), 10 µl GelRedTM. Potřebné chemikálie byly smíchány a zahřívány v mikrovlnné troubě do rozvaření. Tekuté médium bylo nalito do speciálních forem s hřebeny, které vytvoří v gelu jamky. Ztuhlý gel byl ponořen do elektroforézní vany s 0,5x TAE pufrům.

Vzorky DNA byly smíchány s DNA Gel LoadingDye (6x) v poměru 5:1 a vneseny do jamek v gelu. Pro určení délky fragmentů DNA byl použit marker 1000 bp plus Gene Ruler (2 µl) od firmy ThermoScientific. Vizualizace gelů probíhala pomocí G:BOX s UV transiluminátorem a program GeneSnap (SynGene).

0,5x TAE:	
TRIS base	121 g
Kyselina octová (vychlazená)	2,5 ml
EDTA	50 ml
dH ₂ O	421,5 ml

Tabulka 10: Složení 0,5x TAE pufru

3.4.6. Klonování MultiSite Gateway – BP (nebo TA) a LR reakce

Pro možnost transformace, a tedy přenosu námi zvolené sekvence mezi bakterií po finální rostlinu musí nejprve proběhnout BP klonázová reakce, která umožní zaklonovat amplifikovaný produkt do vektoru – plazmidu (viz tabulka 2), čímž vznikne Entry vektor.

Pro BP klonázovou reakci byly všechny látky dle tabulky 11 byly smíchány v 200 μ l zkumavce a ponechány přes noc při pokojové teplotě. Druhý den ráno byl přidán 1 μ l proteinázy K a směs byla inkubována po dobu 15 minut při 37°C v cycleru (Biometra TAdvanced). Hotový produkt byl následně použit při elektroporaci. Kromě klonování do pDONR P4P1r bylo v případě promotorové sekvence použito i klonování do pENTR 5'-TOPO. V tomto případě byl použit The pENTR™ 5'-TOPO® TA Cloning® Kit a bylo postupováno dle návodu výrobce (Invitrogen). Reakce probíhala 1 h při pokojové teplotě a složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 11.

Závěrečným krokem této metody je LR reakce, během které se jednotlivé sekvence pomocí LR klonázové reakce spojí v destinačním vektoru za vzniku expresního vektoru. Tato reakce již nebyla z časových důvodů v rámci diplomové práce provedena.

BP klonázová reakce (5 μl):		AT reakce (6 μl):	
PCR produkt	0,5 μ l	PCR produkt	0,5 μ l
P donor	1 μ l	pENTR 5'-TOPO vektor	1 μ l
Klonáza BP	1 μ l	Solný roztok	0,2 μ l
Mili – Q H ₂ O	2,5 μ l	Sterilní H ₂ O	4,3 μ l

Tabulka 11: Složení směsi klonázové reakce

3.4.7. Elektroporace

Produkt BP (nebo LR) klonázové reakce (1 μ l) byl smíchán s elektrokompetentními buňkami E. coli (dh 5 α), které jsou uchovávány v deepfreezeru při teplotě – 60°C. Po 1 minutě byla směs napipetována do elektroporační kyvety a vložena do elektroporátoru s příslušným programem (Bio-Rad Gene Pulser Aparatus, nastaven na 25 μ F, 200 Ω a 2,5 kV). Následovalo přidání 1 ml SOC1 média (Super Optimal broth with Catabolite repression) o složení: pepton 2%, kvasniční extrakt 0,5%, glukóza 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 25 mM,

MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM. Následovalo přelití do sterilní zkumavky. Zkumavky byly ponechány 1 hodinu na třepačce při teplotě 37°C.

Po 1 hodině byla směs zakonzentrována krátkým stočením (10 s) na cetrifuze. A resuspendována ve 100 µl SOC1. Elektroporát byl vyset na LB médium (lysogeny broth) kanamycinem (50 ng/µl) a umístěn opět do 37°C do druhého dne.

3.4.8. Příprava ploten

LB médium: 10 g/l pepton, 10 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl a 17 g/l agaru. 200 ml sterilního LB média bylo rozvařeno v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí na 60°C bylo přidáno 200 µl antibiotika – kanamycinu (50 mg/ml) po BP reakci, spectinomycinu (100 mg/ml) po LR reakci. Směs byla pečlivě rozmíchána. Poté bylo médium nalito do sterilních Petriho misek (9 cm). Vychladlé misky byly uzavřeny parafilmem.

3.4.9. Kontrolní PCR kolonií (Colony PCR) a příprava miniprepu

Následující den byla provedena Colony PCR za účelem ověření, zda byla získaná sekvence úspěšně zaklonována do vektoru. Kvůli negativním výsledkům byly vyzkoušeny primery M13 a také specificky navržené primery.

Sterilním párátkem byla odebrána část vybrané kolonie, která byla přemístěna do 200 µl zkumavky, kam bylo poté napipetováno 10 µl PCR premixu (viz tabulka 13). Časové a teplotní schéma reakce pro primery uvádí tabulka 13.

Produkt amplifikace byl zkontrolován pomocí elektroforézy (viz kapitola 3.4.5.)

Premix (10 µl):	Primery M13	Navržené primery
H ₂ O	8,28 µl	15,56 µl
Pufr 10x DreamTaq	1,00 µl	2,00 µl
Primer	0,25 µl M13 F-20 (20µM)	1,00 µl
Primer	0,25 µl M13 R-26 (20µM)	1,00 µl
dNTP	0,20 µl	0,40 µl
DreamTaq polymeráza	0,02 µl	0,04 µl

Tabulka 12: Složení reakční směsi Colony PCR

DreamTaq polymeráza program			
Krok	Teplota	Čas (min)	Opakování
Počáteční denaturace	94°C	2:00	1x
Denaturace	94°C	0:30	30x
Nasednutí primerů*	47 °C nebo 54 °C	1:00	30x
Polymerace	72°C	1:00	30x
Dosyntetizování	72°C	10:00	1x
Ukončení	10°C	∞	1x

Tabulka 13: Časové a teplotní schéma PCR – DreamTaq polymeráza, * dle použitého primeru

3.4.9.1. Zaočkování pozitivních kolonií

U pozitivně testovaných kolonií E. coli bylo pomocí sterilního párátko provedeno zaočkování do 3 μ l tekutého LB média (10 g/l pepton, 10 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl, s kanamycinem (50 ng/ μ l)). Zkumavka s párátkem byla vložena do třepačky s 37°C, kde se nechala inkubovat do druhého dne.

3.4.9.2. Příprava miniprepu

Pro přípravu miniprepu byl použit kit Zymo research Plasmid Miniprep classic. Postupovalo se dle návodu od výrobce.

Koncentrace vyizolované DNA byla stanovena na NanoDropu (ThermoScientific).

3.4.10. Kontrolní restrikce

Pomocí vhodného restrikčního enzymu a příslušného pufru lze ověřit úspěšnost klonování metodou restrikce DNA z miniprepů. Výběr restrikčního enzymu proběhl pomocí programu Geneious 8.1.9 a byla zvolena Taq 1 restriktáza nebo kombinace restriktáz PvuII a SphI. Vhodný restrikční enzym optimálně štěpí vektor i amplifikovanou sekvenci tak, že jde odlišit fragmenty prázdného vektoru a vektoru se zaklonovanou sekvencí.

Kontrolní restrikce (20 μl):	
DNA (při koncentraci cca 100 ng/ μ l)	2 μ l
Restriktáza	0,2 μ l

Pufř	2 μ l
Milli – Q H ₂ O	doplnit do 20 μ l

Tabulka 14: Složení reakční směsi kontrolní restrikce

Při kombinaci více restriktáz bylo dávkováno od každé 0,2 μ l. Pufř byl vybrán podle použité restriktázy či restriktáz, dle NEB double digest protokolu <https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>

Reakční směs (viz tabulka 14) se nechala inkubovat 1 h v teplotě podle zvoleného enzymu. Pro zjištění výsledků byla následně provedena agarózová elektroforéza. Při použití TaqI restriktázy je používán 2% gel, pro ostatní stačí běžně používaný 1,2%.

Po úspěšné restrikci byl vzorek poslán na sekvenaci. Vzorek pro sekvenci byl připraven podle návodu sekvenační laboratoře Genseq s.r.o. (<http://www.genseq.cz/>). Bylo smícháno 5 μ l templátu (koncentrace plasmidové DNA 80-100 ng/ μ l nebo PCR produktu 20-80 ng/ μ l) a 5 μ l primeru (5 μ M (5 pmol/ μ l)). Jako primery byly použity primery M13. Je – li sekvence příliš dlouhá a sekvenace od M13 míst nestačí k celému pročtení je použit primer specifický ke klonované sekvenci.

3.4.11. Příprava kalusu

Za účelem přípravy transgenní rýže bylo postupováno podle publikovaného protokolu (Main et al., 2015). Nejprve bylo oloupano 5 zrn rýže (*Oryza sativa*, cv. Nipponbare), která byla sterilována 70% etanolem po dobu 1 minuty, omyta vodou a 15 minut ponechána v 50% Savu. Zrna byla omyta sterilní vodou. Poté co oschnula byla ve sterilních podmínkách přenesena na iniciační médium o složení: 4 g/l N6 soli (Chu, 1975), 2 mg/l 2,4 – D, 300 mg/l hydrolyzát kaseinu, 2,8 g/l L – prolin, 30 g/l sacharóza, 4 g/l fytogel (pH 5,8) a 1 ml/l N6 vitaminový zásobní roztok (2 g/l L – glycin, 1 g/l L – thiamin, 0,5 g/l L – pyridoxin, 0,5 g/l L – nikotinová kyselina). Na tomto médium byla ponechána 15 dní. Po 15 dnech byly narostlé cca 1 cm velké kalusy, kterým byl odstraněn vznikající prýt. Tyto kalusy byly následně přeneseny na nové iniciační médium o stejném složení, kde rostly další týden.

3.4.12. Infekce kalusu pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Vzhledem k časové náročnosti přípravy konstruktů i celého procesu transformace rýže byla v rámci diplomové práce provedena testovací transformace kalusu pomocí *Agrobacterium* (kmen C58C1) nesoucí konstrukt s pCP60s (připravil Dimitrij Tyč). Před transformací bylo

Agrobacterium pěstováno 3 dny na YEP médiu - 5 g/l kvasnicový extrakt, 10 g/l pepton, 5 g/l NaCl, 15 g/l Bacto agar – obohaceném o antibiotika při teplotě 19°C. Část kultury (3 ml) byla přenesena do sterilní 50 ml falkony obsahující 15 ml tekutého infekčního média: 4 g/l N6 soli, 1 ml/l N6 vitaminový stock, 1,5 mg/l 2,4 -D, 68,4 g/l sacharóza, 36 g/l glukóza, 0,7 g/l L-prolin (pH 5,2) na závěr bylo přidáno 100 mg/ml claforamu (carbenicillinu). Směs byla umístěna do centrifugy na 5000 otáček na 5 minut. Vzniklá peleta byla rozpuštěna v 5 ml tekutého infekčního média. 1 ml byl odebrán pro měření denzity. Připravené kalusy rostlé na iniciačním médiu byly ponořeny do 5 ml tekutého infekčního média v 50 ml kádince, následně byla tekutina odsáta a kádinka vložena na 2 minuty do vortexu. Poté byly kalusy přeneseny na filtrační papír, kde volně uschly. Suché kalusy byly přemístěny na dva kusy filtračního papíru, které byly navlhčeny 1,5 ml tekutého infekčního média. Petriho misky s kalusy byly utěsněny parafilmem a umístěny na 3 dny do kultivační místnosti s teplotou 25°C. Práce byla prováděna za sterilních podmínek ve flow boxu. Následně byly kalusy přeneseny na selekční médium: 4 g/l N6 soli, 1 ml/l N6 vitaminový stock, 2 mg/l 2,4 – D, 300 mg/l kasein, 2,8 g/l L – prolin, 30 g/l sacharóza, 4 g/l fytogel (pH 5,8). Po vyklávkování média bylo přidáno 50 mg/l hygromycinu a 250 mg/l claforamu. Petriho misky byly opět uzavřeny parafilmem. Po dobu 4 týdnů byly ponechány při 30°C v sušárně. Aktivně rostoucí kalusy byly přeneseny na regenerační médium I.– 4,3 g/l MS soli, 2 mg/ l kinetin, 2 g/l hydrolyzát kaseinu, 30 g/l sacharóza, 30 g/l sorbitol, 8 g/l agar, 0,02 mg/l NAA (naphthaleneacetic acid). Po vyklávkování přidáno 1 ml/l MS zásobního roztoku vitaminů (2 g/l glycin, 0,5 g/l thiamin, 0,5 g/l pyridoxin a 0,05 g/l nikotinové kyseliny), 1 ml/l claforamu, 0,5 ml/l kanamycinu. Misky s kalusy byly poté uzavřeny ventilující páskou a umístěny do kultivační místnosti s teplotou 25°C a fotoperiodou světlo/tma 16/8 h.

3.5. Regenerace rostliny z kalusu

Za účelem ozkoušení protokolu a jeho optimalizace byla testována regenerace celistvých rostlin z de-novo odvozených kalusů. Byla vynechána pasáž infekce *Agrobacteriem*. Rýžové kalusy byly odvozené dle postupu výše (kapitola 3.4.11.). Po 17 dnech bylo regenerační médium I (viz kapitola 3.4.12.) vyměněno za regenerační médium II (4,3 g/l MS soli, 1 ml/l vitaminový stock, 30 g/l sacharóza, 100 mg/l myo – inostol, 3 g/l Fytogel). Sterilní plastové Petriho misky byly uzavřeny ventilující páskou a umístěny do kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8 h, 25°C.

4. Výsledky

4.1. Vliv nedostatku fosforu (P) na růst a diferenciaci apoplastických bariér u 6 kultivarů ječmene *Hordeum vulgare* (Experiment 1)

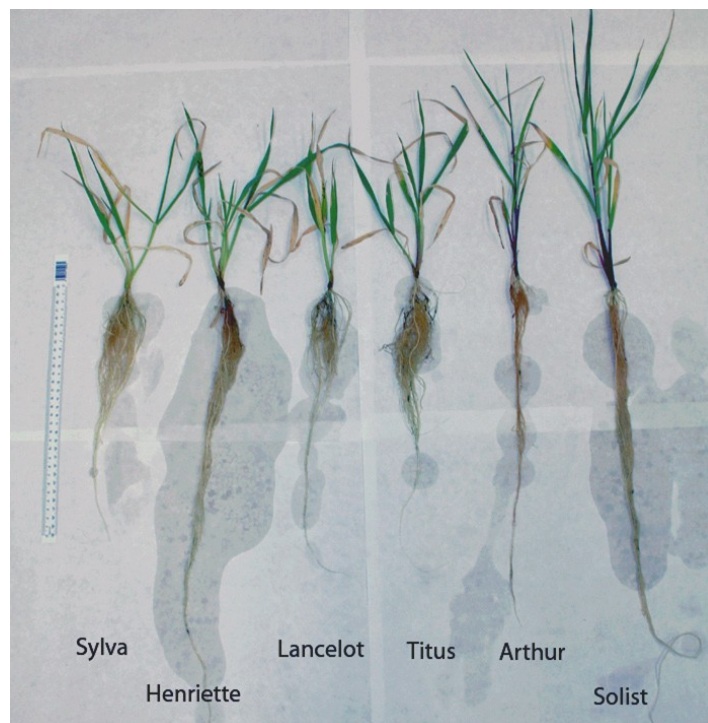
Původním záměrem tohoto pokusu bylo vybrat na základě morfologických vlastností kořene kultivar, který tvoří exodermis pro pokusy s protilátkami k fosfátovým transportérům. Jelikož kultivary v obou variantách kultivace (kontrolní a P deficientní varianta) mezi sebou vykazovaly na první pohled jasné rozdíly (Obr. 10 a 11), rozhodli jsme se je porovnat ve více aspektech, nikoliv jen na úrovni kořenového systému. Porovnávána byla délka a suchá hmotnost prýtu, délka, suchá hmotnost kořenového systému, celková hmotnost suché biomasy a stupeň diferenciaci apoplastických bariér v různě starých částech kořene.

4.1.1. Fenotypové rozdíly mezi jednotlivými kultivary a vliv deficiencie P

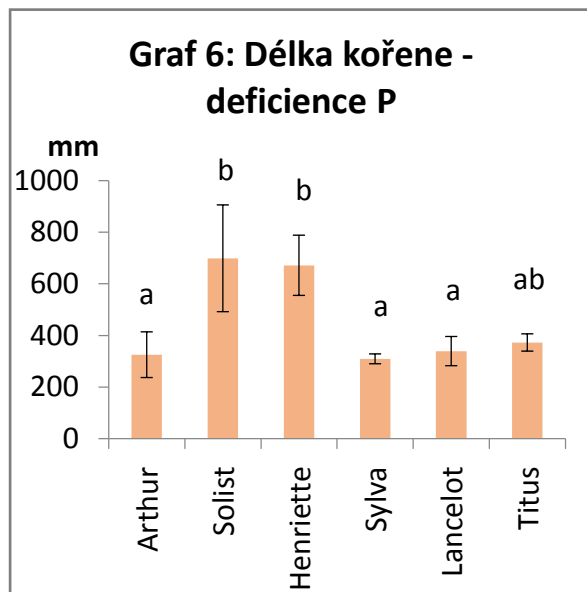
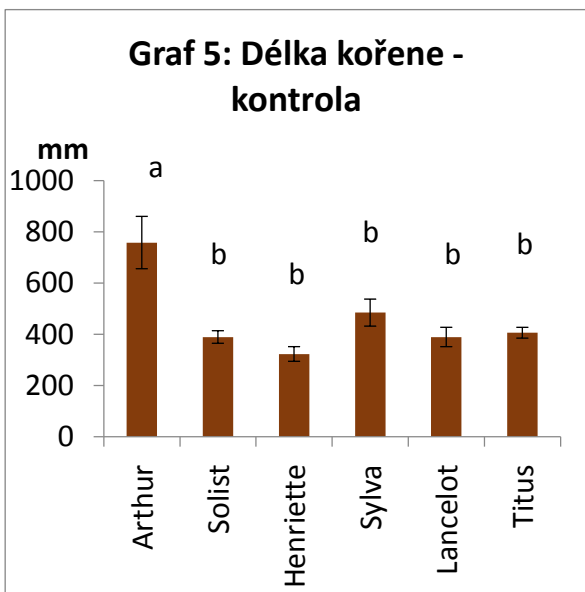
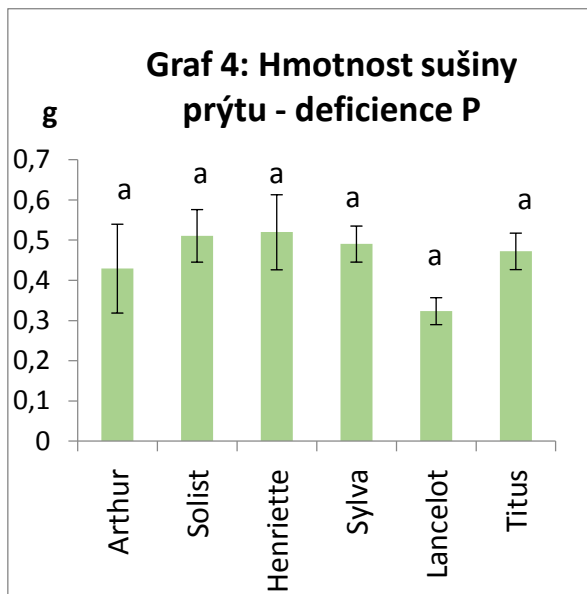
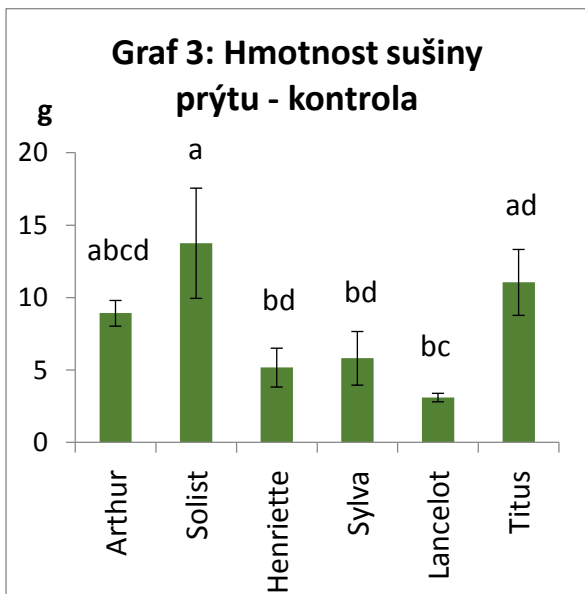
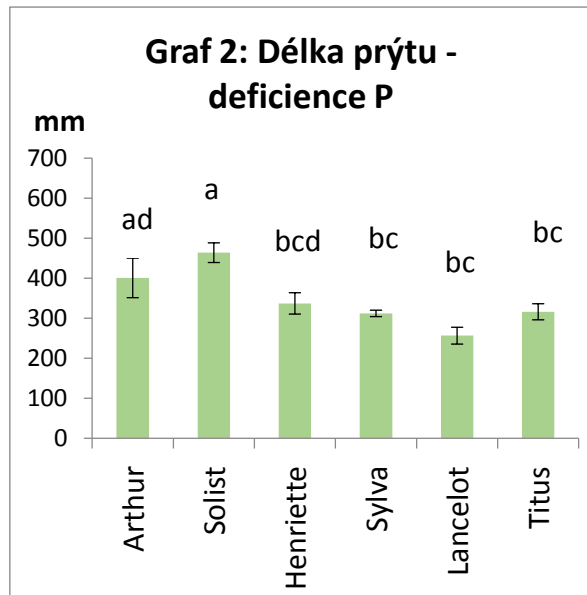
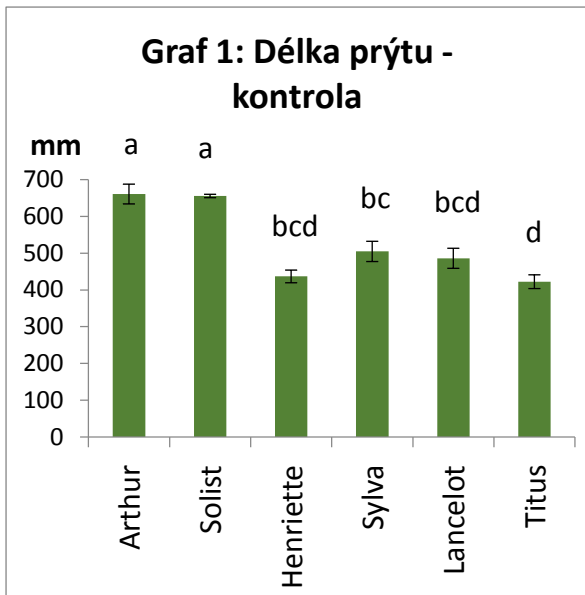
Deficience fosforu měla vliv na všechny zkoumané parametry. U všech kultivarů byl prýt v deficientním roztoku kratší než v kontrole (GLM, $p < 0,05$), signifikantní byly také rozdíly mezi jednotlivými kultivary jak v kontrolním, tak deficientním roztoku, kdy v obou variantách jarní kultivary převyšovaly ozimé (Graf 1 a 2, ANOVA, $p < 0,001$). Nejen délka prýtu, ale i hmotnost sušiny prýtu zaznamenala mezi kultivary rozptyl v kontrolním roztoku (Graf 3, ANOVA, $p < 0,05$), avšak v deficienci nebyly rozdíly signifikantní ($p = 0,134$). Co se týče délky kořenového systému, zde byl pozorován jiný trend než u prýtu, tedy nikoli obecný vliv snížené dostupnosti fosforu (GLM, $p > 0,05$), ale spíše reakce jednotlivých kultivarů. Některé kultivary reagovaly na deficienci fosforu zvýšenou elongací svých kořenů – z jarních kultivarů Solist a z ozimých kultivarů Henriette, jiné měly kořeny kratší než v kontrolní variantě (Graf 5 a 6, ANOVA, $p < 0,001$). Suchá hmotnost kořenů však byla ovlivněna variantou kultivace, tj. byla v deficienci výrazně nižší u všech kultivarů (GLM, $p < 0,001$). Zároveň byly v kontrolní i deficientní variantě mezi kultivary signifikantní rozdíly (Graf 7 a 8, ANOVA, $p < 0,001$). Celková hmotnost sušiny byla také v deficientní variantě nižší (GLM, $p < 0,001$), avšak mezi kultivary z deficiencie nebyl signifikantní rozdíl (Graf 10, ANOVA $p = 0,056$). Signifikantní však byly rozdíly v R/S poměru mezi kultivary v deficientní variantě (Graf 12, ANOVA, $p < 0,001$), zatímco v kontrole nikoli ($p = 0,072$), varianta kultivace R/S poměr významně ovlivnila (GLM, $p < 0,05$).

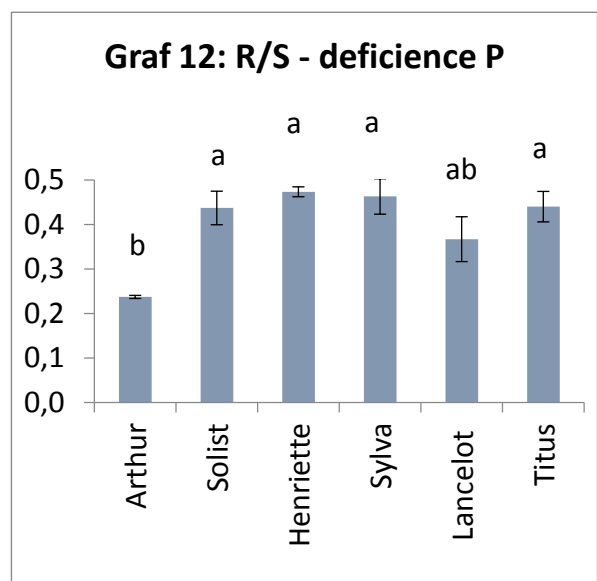
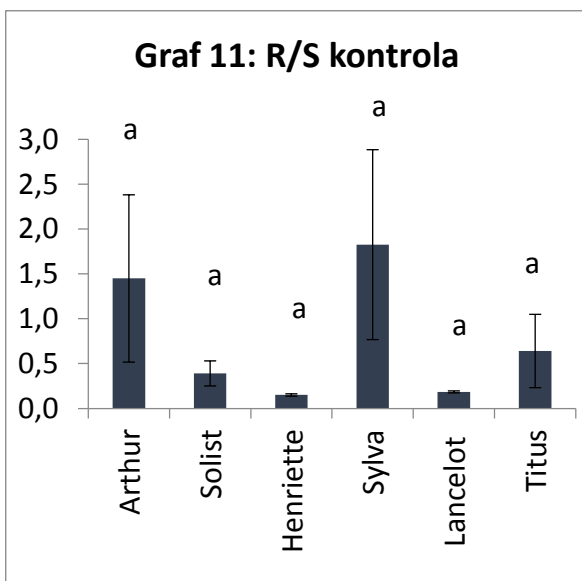
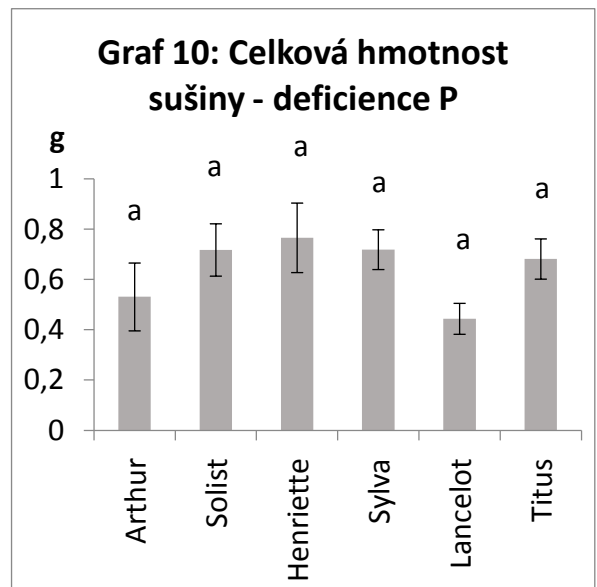
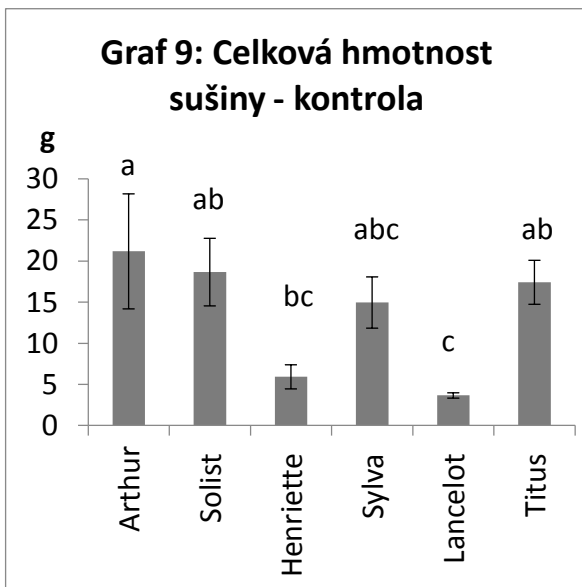
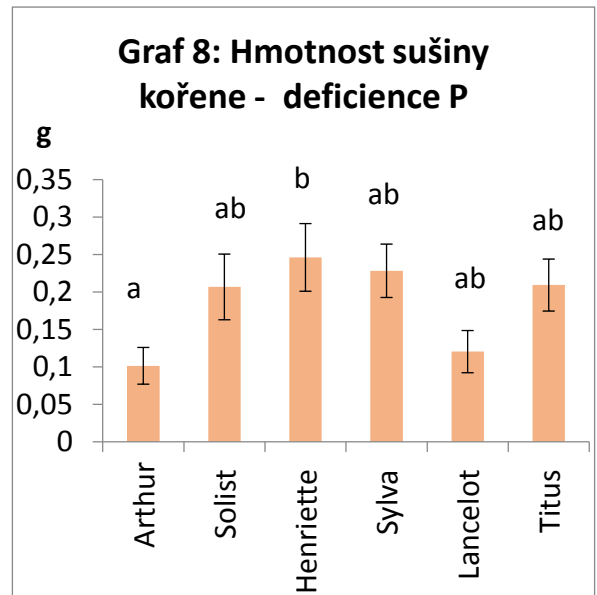
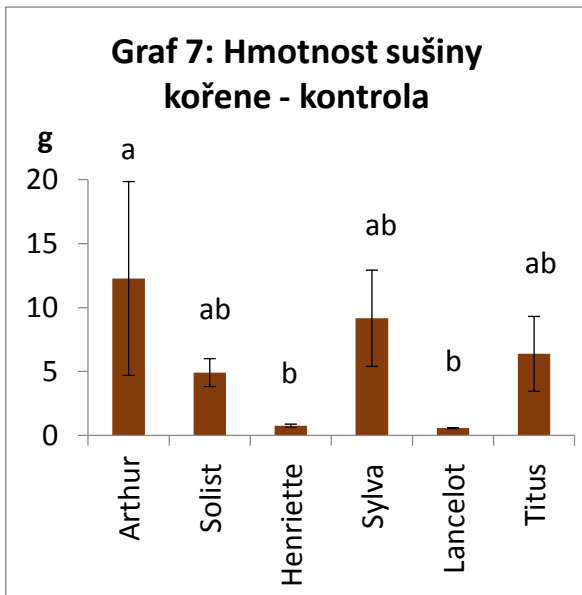


Obrázek 10: Kultivary ječmene – kontrolní varianta. Rostliny kultivované 35 dní ve ¼ Hoaglandově roztoku. Ozimé kultivary: Sylva, Henriette, Lancelot, Titus; jarní kultivary: Arthur, Solist.



Obrázek 11: Kultivary ječmene – deficientní varianta. Rostliny kultivované týden ve ¼ Hoaglandově roztoku, následně 4 týdny v deficientním ¼ Hoaglandově roztoku s obsahem $0\mu\text{M P}$. Ozimé kultivary: Sylva, Henriette, Lancelot, Titus; jarní kultivary: Arthur, Solist.





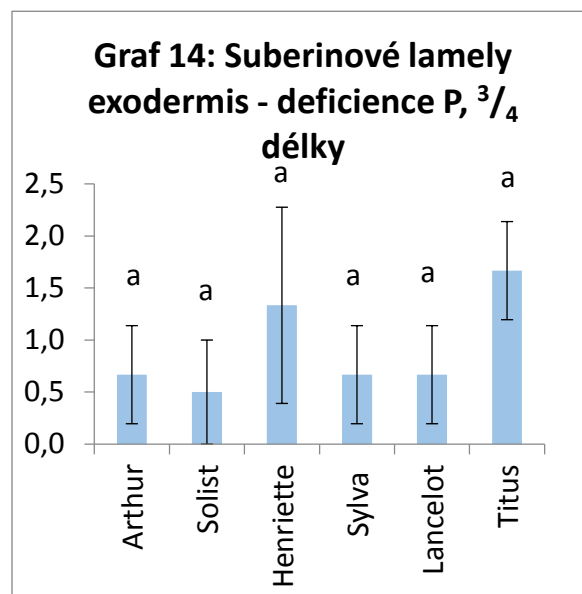
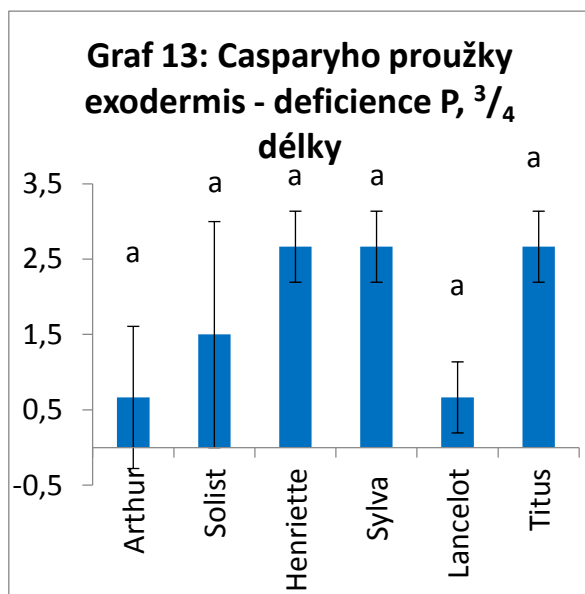
Graf 1 – 12: Biometrické charakteristiky kultivarů ječmene v kontrolní a deficientní variantě. Ozimé kultivary: Sylva, Henriette, Lancelot, Titus; jarní kultivary: Arthur, Solist. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test, $n = 3$). Chybové úsečky v grafech ukazují směrodatnou odchylku.

4.1.2. Apoplastické bariéry

Stěžejní částí porovnávání kultivarů bylo histochemické barvení apoplastických bariér (Obr. 12 A-F). Středem zájmu bylo zjistit, který kultivar výrazně diferencuje exodermis a zda deficientní podmínky indukují dřívější diferenciaci apoplastických bariér.

K detekci apoplastických bariér byly odebrány kořeny z rostlin rostoucích v kontrolním i deficientním roztoku (Tabulka 15). Z tabulky 15 je patrné, že se odebrané kořeny lišily v délce v závislosti na variantě kultivace a kultivaru, ale že deficiencie neměla na rostliny vliv, co se týče podílu nevětvené části k celkové délce kořene (GLM, $p > 0,05$). Řezy byly u všech kořenů provedeny ve $\frac{3}{4}$ délky kořene od špičky. K hodnocení četnosti výskytu Casparyho proužků a suberinových lamel byly zavedeny kategorie, viz tabulka 16. Kontrolní rostliny nevykazovaly žádnou tvorbu CP v hypodermis (bez grafu). Pouze u jediného kultivaru Sylva se v minimální míře objevily SL ($n = 3$, průměrná kategorie = 0,67, což vypovídá o velice nízké četnosti výskytu pouze u ojedinělých buněk v exodermální vrstvě). Rostliny z kontrolní varianty tedy exodermis nevytvářely, zatímco rostliny z deficientní varianty exodermální CP v různé míře tvořily (GLM, $p < 0,001$), ale bez signifikantního rozdílu mezi kultivary (Graf 13, ANOVA, $p > 0,05$). Tvorba SL v exodermis v deficientní variantě byla taktéž zaznamenána (GLM, $p < 0,001$). V menším rozsahu a opět bez signifikantních rozdílů mezi kultivary (ANOVA, $p = 0,382$). Při pohledu na diferenciaci SL v endodermis lze pozorovat signifikantní rozdíl mezi variantami kultivace (GLM, $p < 0,05$), u deficiencie výraznější uzavření, avšak nikoli mezi kultivary v rámci jednotlivých variant (ANOVA, deficiencie, $p = 0,627$; kontrola, $p = 0,879$), neboť je endodermis u všech kultivarů v pokročilém stádiu diferenciaci (Tabulka 15). CP endodermis ve $\frac{3}{4}$ nebyly zkoumány, protože se diferencují již blízko za špičkou, po celém obvodu endodermis a téměř nezávisle na podmínkách prostředí oproti exodermis. Jelikož výskyt CP v exodermis ve $\frac{3}{4}$ délky kořenů rostlin z deficientního roztoku naznačoval poměrně pokročilý stupeň diferenciaci exodermis u všech kultivarů a rozdíly mezi kultivary nebyly statisticky významné, byl dodatečně udělán rozbor stavu exodermis i v $\frac{1}{2}$ délky těch samých kořenů, kde tentokrát byly zaznamenány signifikantní rozdíly ve výskytu exodermálních CP mezi kultivary (Graf 15, ANOVA, $p < 0,05$). SL nebyly v $\frac{1}{2}$ pozorovány v téměř žádném případě (bez grafu).

Dle výsledků této analýzy byl také vybrán kultivar Henriette pro následné imunodetekční experimenty, neboť tvořil v deficientním roztoku CP i SL ve větší míře, navíc byl pozorován nárůst délky kořene, nárůst hmotnosti sušiny kořene i celkové biomasy a hmotnosti sušiny prýtu, čím se lišil například od kultivaru Titus, u nějž byla tvorba SL výraznější.



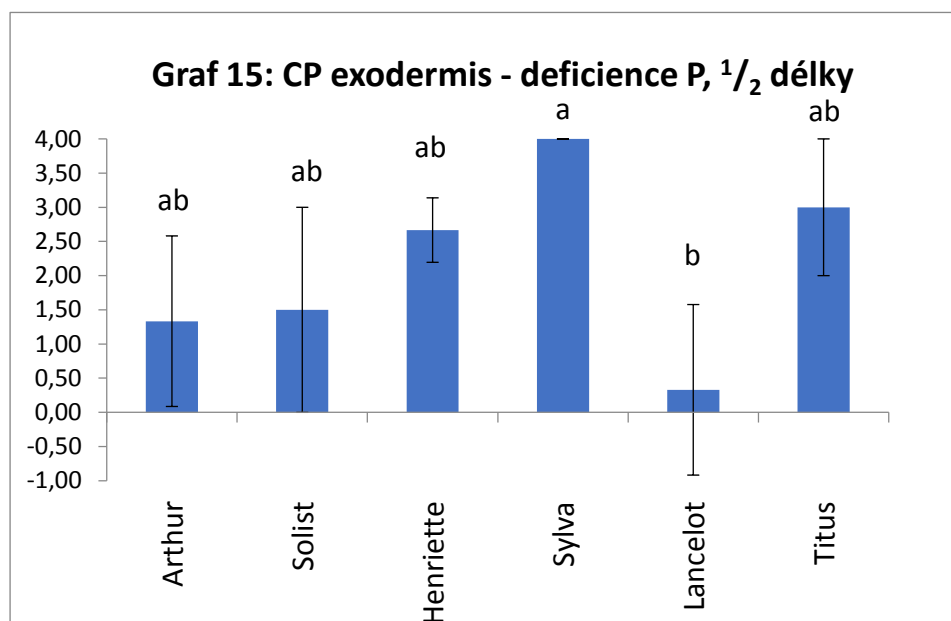
Graf 13 a 14: Zobrazení četnosti výskytu CP a SL ve $\frac{3}{4}$ délky kořenů rostlin z roztoku deficientního na fosfor. Četnosti jsou vyjádřeny pomocí kategorií uvedených v tabulce 16. Chybové úsečky v grafech ukazují směrodatnou odchylku (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$, $n = 3$, pouze Solist $n = 2$)

Průměrné délky kořenů sloužících pro detekci apoplastických bariér ve $\frac{3}{4}$ a četnost výskytu suberinových lamel v endodermis ve $\frac{3}{4}$ délky kořene								
Kultivar	Kontrola (mm)	SO	Deficiencie P (mm)	SO	SL endo kontrola	SO	SL endo deficiencie P	SO
Arthur	467,67	5,55	324,00	4,04	3,33	0,47	3,67	0,47
Solist	279,00	4,95	549,00	2,21	2,33	0,47	4	0
Henriette	268,33	6,84	684,33	40,03	3,33	0,47	3,66	0,47
Sylva	384,33	2,16	311,33	5,59	3,33	0,47	4	0
Lancelot	354,33	3,02	350,67	4,67	3	0	4	0
Titus	247,00	2,26	341,00	12,30	3	0,82	4	0

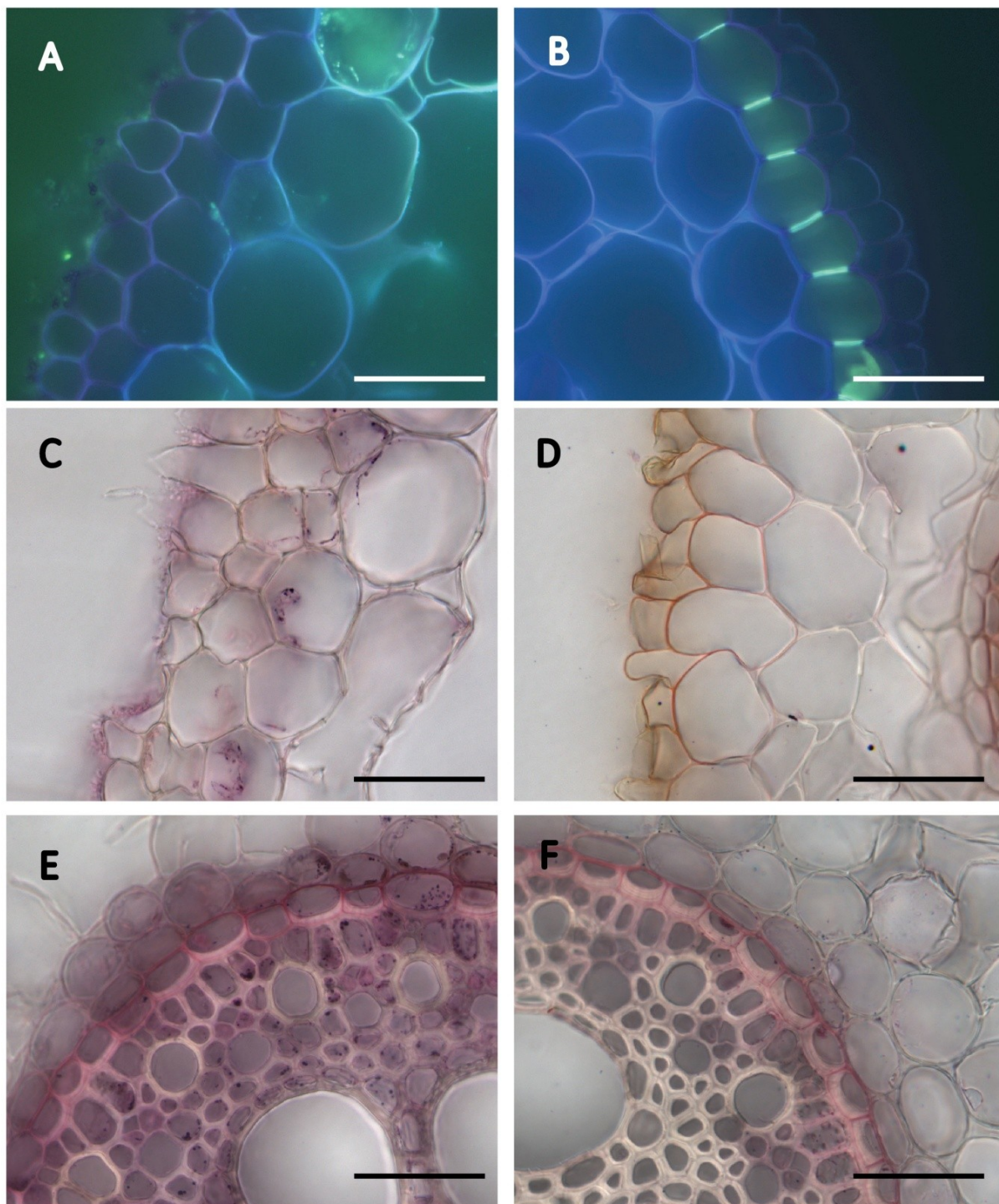
Tabulka 15: Průměrné délky kořenů kultivarů a jejich směrodatné odchylky (SO) z kontrolního i deficientního roztoku, u kterých byla provedena detekce apoplastických bariér a četnost výskytu suberinových lamel endodermis (endo) u těchto kořenů a jejich směrodatné odchylky (SO); $n = 3$, pouze Solist $n = 2$.

Kategorie četnosti výskytu CP a SL v 1/2 a 3/4 délky	
0	žádné buňky (0%)
1	ojedinělé buňky (20%)
2	přibližně 50% buněk
3	většina buněk 75%
4	kompletně uzavřená exo/endodermis (100%)

Tabulka 16: Popis kategorií četnosti výskytu CP a SL ve 1/2 a 3/4 délky kořene



Graf 15: Zobrazení četnosti výskytu CP v 1/2 délky kořenů rostlin z roztoku deficientního na fosfor. Četnosti jsou vyjádřeny pomocí kategorií uvedených v tabulce 16. Chybové úsečky v grafech ukazují směrodatnou odchylku (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$, $n = 3$, pouze Solist $n = 2$).



Obrázek 12 A – F: Apoplastické bariéry ve $\frac{3}{4}$ délky kořene (od špičky) u kultivaru Henriette; A, C, E – kontrolní varianta; B, D, F – P deficientní varianta; A, B – Casparyho proužky v exodermis (barveno berberinem a genciánovou violetí, UV); C, D – suberinové lamely exodermis; E, F – suberinové lamely endodermis (barveno Sudanem Red 7B, světlé pole); měřítko odpovídá 50 μm

4.2. Fenotypové rozdíly mezi jednotlivými kultivary v deficienci P – Experiment 2

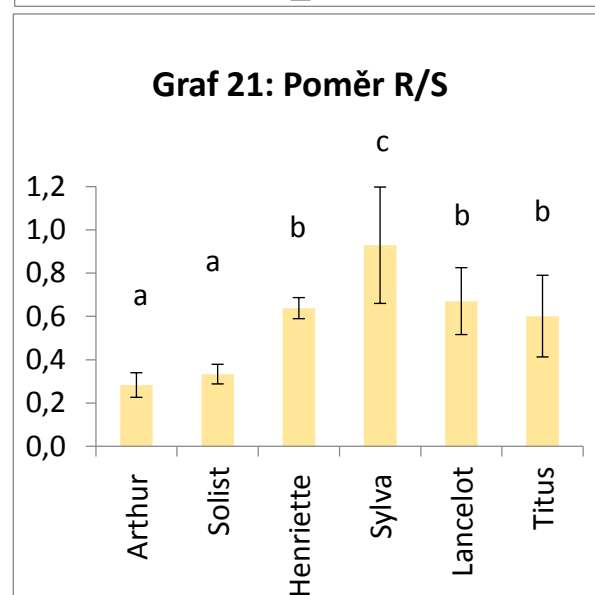
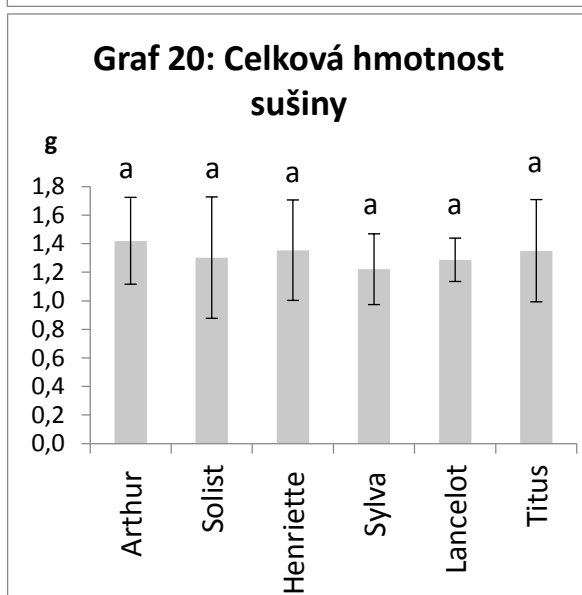
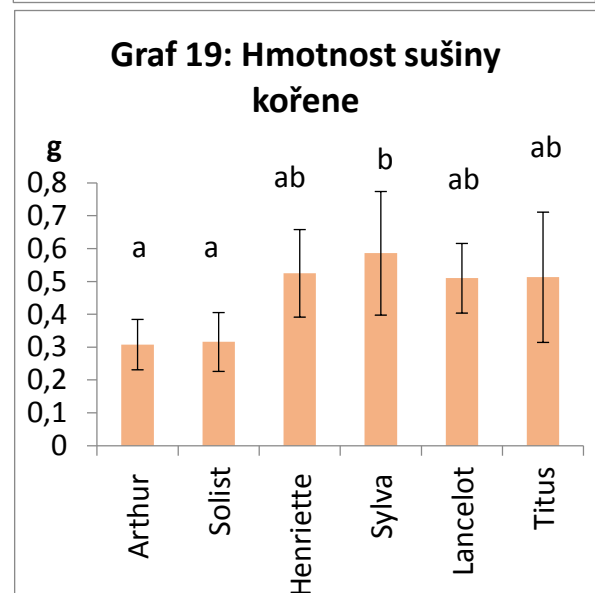
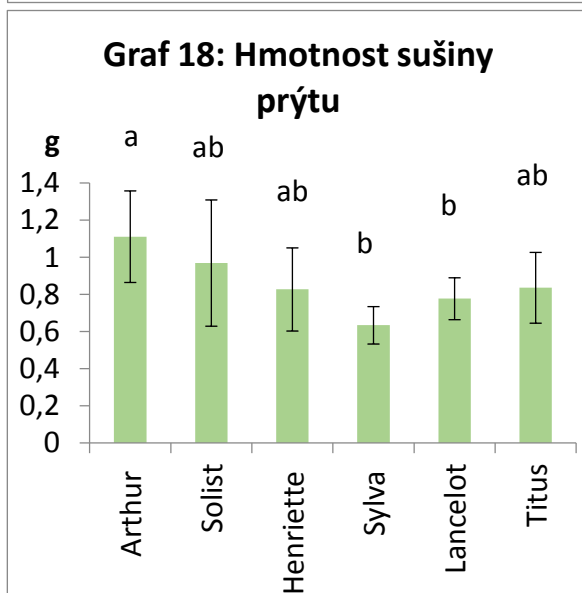
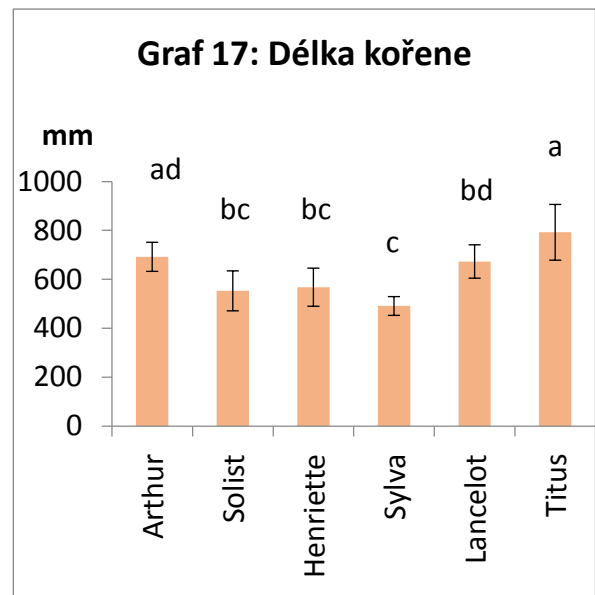
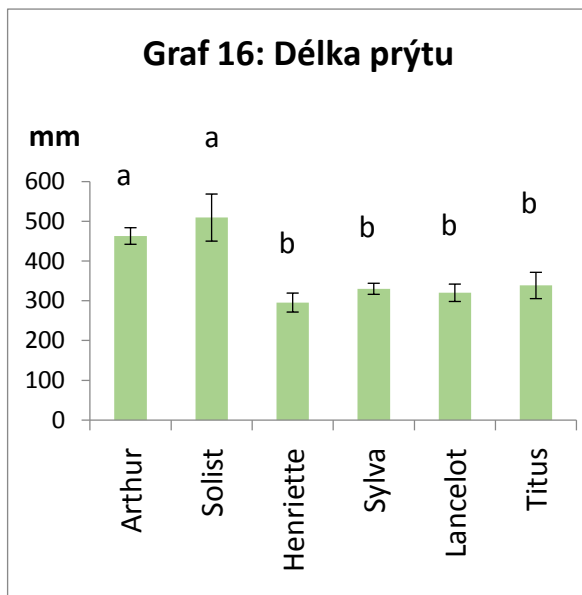
Tento experiment proběhl téměř totožně jako Experiment 1, pouze s větším počtem vzorkovaných rostlin $n = 9$ a byla kultivována pouze deficientní varianta. Cílem tohoto experimentu bylo ověření předchozích výsledků na větším vzorku rostlin.

Kultivace rostlin probíhala týden ve $\frac{1}{4}$ Hoaglandově roztoku, následně byly rostliny na 4 týdny přesazeny do roztoku stejného složení, avšak bez obsahu fosfátu. Každý týden byl roztok vyměněn za čerstvý.

Kultivary se výrazně lišily délkou nadzemní části, tedy prýtu (Graf 16, ANOVA, $p < 0,001$), i hmotnost sušiny pýru byla odlišná (Graf 18, ANOVA, $p < 0,05$). Stejně tak se lišily délkou a váhou kořenů (Graf 17, 19 ANOVA, $p < 0,001$). Hmotnost sušiny celé biomasy však byla napříč kultivary bez rozdílu ($p = 0,858$). Rozdíly poměru kořene ke stonku mezi kultivary byly významné (Graf 21, ANOVA, $p < 0,001$).

Reakce jednotlivých kultivarů na deficientní podmínky se mezi oběma kultivacemi lišila, tudíž výsledky první kultivace nebyly druhou kultivací o větším počtu vzorkovaných rostlin potvrzeny. Potvrdila se pouze tendence jarních kultivarů (Arthur a Solist) tvořit delší prýty než ozimé kultivary. Během druhé kultivace tyto dva kultivary dokonce začaly metat klasy, přestože délka kultivace a roční období byly totožné, jako v předešlém případě, kdy do tohoto stádia nedospěly. Zároveň se potvrdila i tendence kultivaru Sylva tvořit v deficienci fosforu velkou kořenovou biomasu, avšak tvořenou krátkými kořeny (Graf 19).

Detekce apoplastických bariér byla provedena pouze u dvou vybraných ozimých kultivarů v $\frac{1}{2}$ délky kořene od špičky, a to u kultivaru Sylva a Lancelot (Tabulka 16 a 17). Kultivar Sylva výrazněji tvořil SL. Tyto dva kultivary byly vybrány na základě Experimentu 1, kdy v obou sledovaných pozicích kultivar Sylva oproti kultivaru Lancelot výrazněji uzavírala exodermis (vykazovala vyšší výskyt diferencovaných CP).



Graf 16 – 21: Rozdílné morfologické znaky kultivarů po kultivaci v roztoku deficientním na fosfor. Odlišná písmena ukazují statisticky významné rozdíly mezi variantami (ANOVA, Bonferroni test, $p < 0,05$, $n = 9$, pouze Solist $n = 8$). Chybové úsečky v grafech ukazují směrodatnou odchylku.

Stav diferenciacie exodermis v ½ délce kořene							
Sylva	Délka kořene (mm)	CP	SL	Lancelot	Délka kořene (mm)	CP	SL
R1	476	0	1	R1	630	4	1
R2	389	2	2	R2	520	1	1
R3	413	4	3	R3	548	0	0

Tabulka 17: Stav exodermis v ½ délce kořenů 3 rostlin kultivarů Sylva a Lancelot. Hodnota pro CP a SL udává kategorii četnosti výskytu dané struktury (CP nebo SL) v exodermální vrstvě; kategorie dle tabulky 17.

4.3. Lokalizace fosfátových transportérů v kořenech rostlin vystavených deficienci P (14 dní v 0 μ M P) – Experiment 3

Stěžejní částí této diplomové práce byly pokusy založené na metodice imunodetekce, pomocí které byla zkoumána lokalizace vysokoafinitních fosfátových transportérů u ječmene (*Hordeum vulgare*) HvPht1;1, 2 v různě starých částech kořene, tj. $1/12$, $1/4$, $1/2$, $3/4$ délky kořene, měřené od špičky. Hlavním cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda s diferenciací apoplastických bariér, především exodermis dochází ke změně lokalizace těchto transportérů, tj. jak je ovlivněno zapojení buněk primární kůry v příjmu živin a jaký má vliv uložení suberinové lamely na přítomnost transportérů.

Celý proces imunodetekce byl několikrát zopakován na nezávisle odebraných kořenech z několika identických kultivací. V některých případech však nebyl pozorován žádný signál, což možná mohlo být způsobeno i aktuálním stavem kořene. Do výsledkové části byly pro hodnocení korelace mezi diferenciací exodermis a lokalizací fosfátových transportérů vybrány jen sady řezů, ve kterých byl signál detekován.

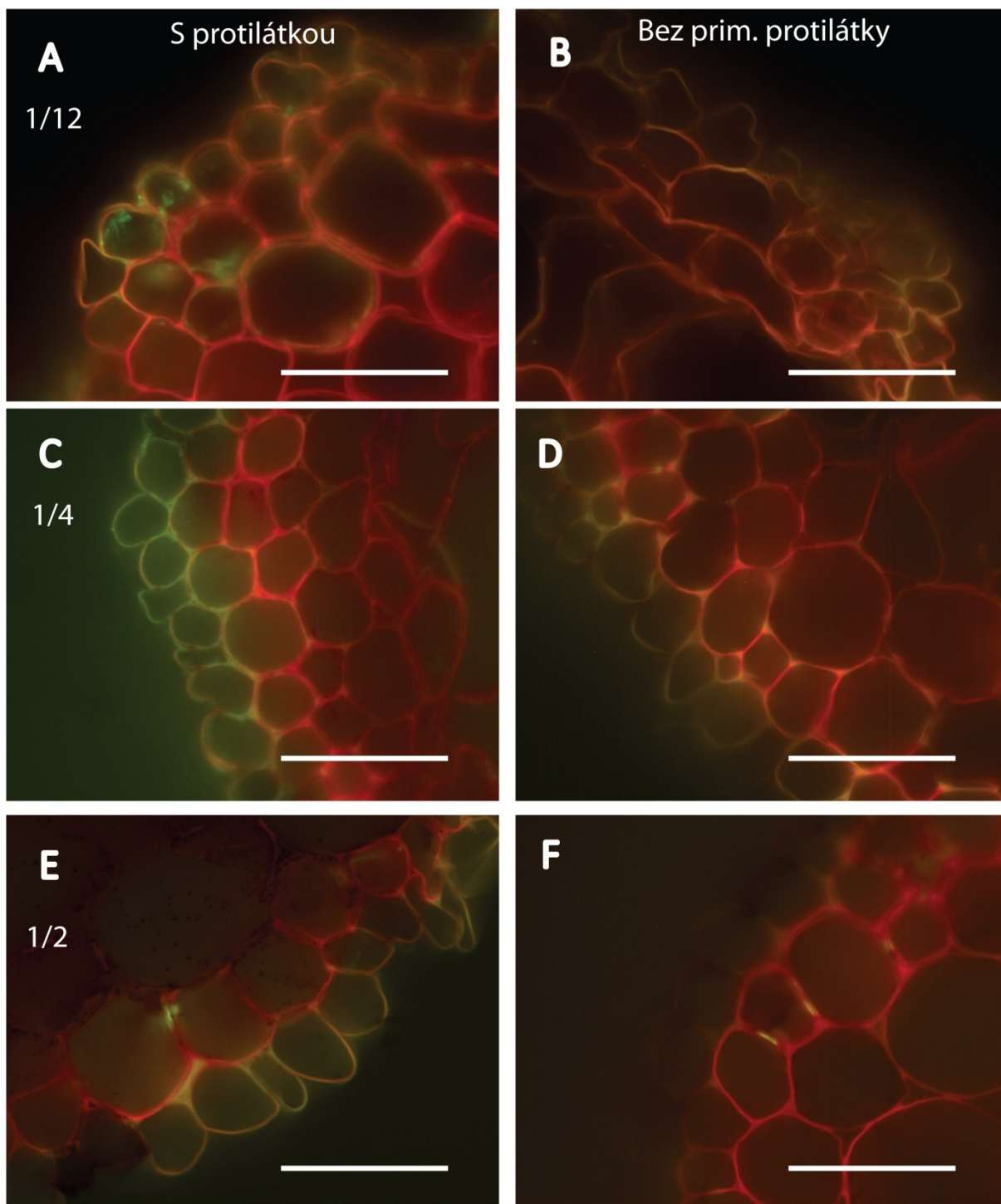
Pro ověření specifity světelného signálu byla zpracována negativní kontrola v podobě imunodetekce bez přidání primární protilátky anti-HvPht1;1, 2, ve které signál patrný nebyl v žádném z řezů (Obr. 13 B, D, F; 14 B). Dále byla specifita signálu ověřována pomocí metody FLIM (Fluorescence lifetime imaging). Tato metoda umožňuje odlišit fluorescenci různých molekul na základě rozdílné rychlosti poklesu (životnosti) fluorescence po excitaci. V tomto případě metoda FLIM dokázala relativně dobře odlišit signál protilátky

od autofluorescence buněčných stěn a pomohla tak ověřit specifickost signálu používané protilátky (Obr. 17).

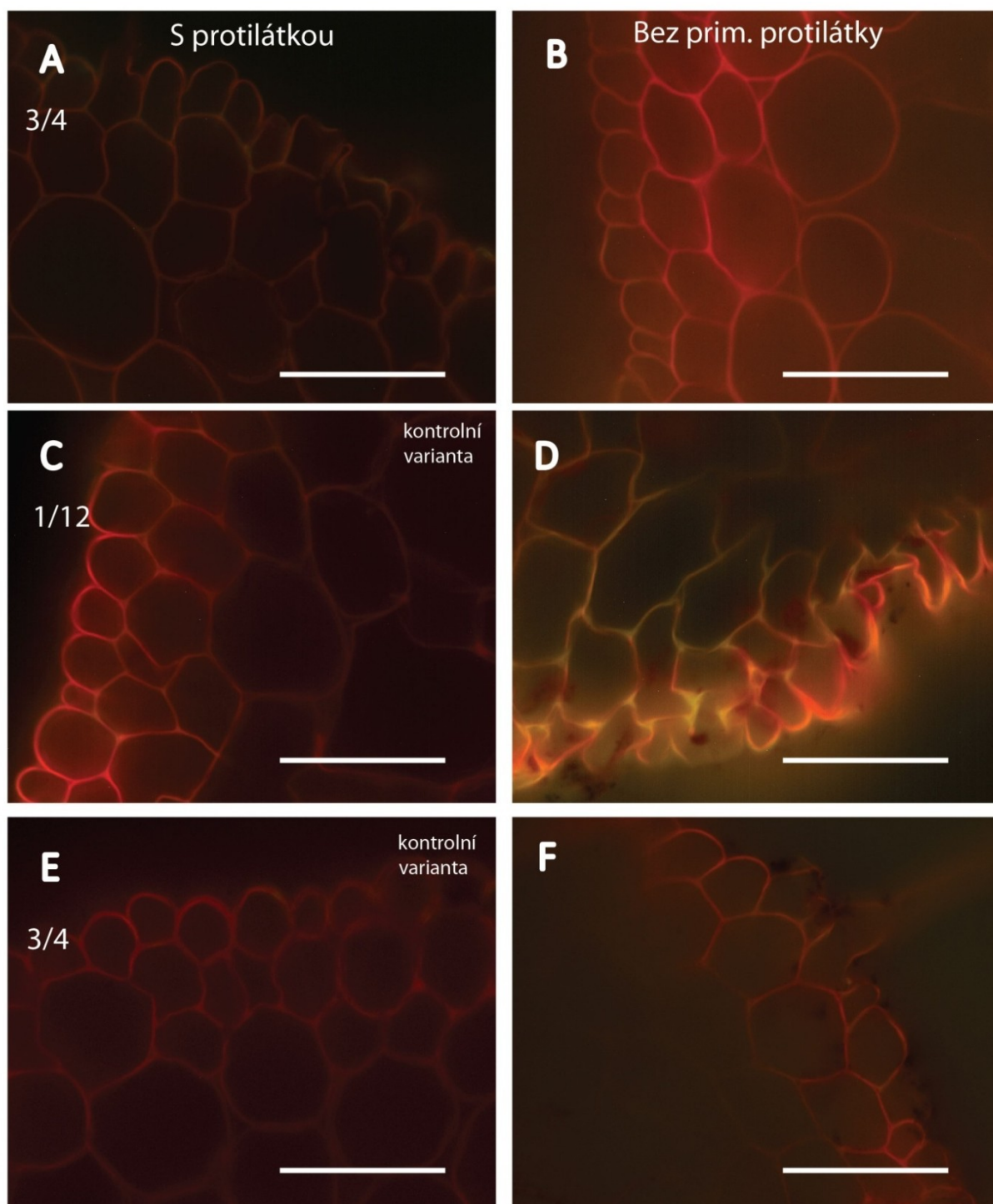
Fosfátové transportéry HvPht1;1, 2 jsou považovány za vysokoafinitní transportéry, sloužící k příjmu fosfátu za jeho nízké koncentrace v substrátu. Tomu odpovídá námi pozorovaný rozdíl v signálu u rostlin pěstovaných v kontrolním roztoku a roztoku deficientním na fosfor. V kontrolní variantě signál zpravidla pozorován nebyl (Obr. 14 C – F), pouze ve dvou výjimečných případech byl zaznamenán signál ojedinelých buněk, což mohlo být způsobeno aktuálním stavem rostliny. Kořeny v kontrolní variantě nevykazovaly přítomnost CP ani SL (Obr. 16 C – F). V deficientní variantě byl signál protilátky pozorován téměř vždy a v různé míře.

U kořenů z roztoku deficientního na fosfor bylo proto dále provedeno detailní hodnocení lokalizace transportérů a stupně diferenciací exodermis (přítomnost Casparových proužků a suberinových lamel) v jednotlivých částech kořene. Z těchto výsledků je patrné, že četnost buněk emitujících signál protilátky anti-HvPht1;1,2 klesala se stářím kořene, tudíž nejsilnější signál byl pozorován blízko za kořenovou špičkou, tzn. v $\frac{1}{12}$ délky celého kořene v buňkách rhizodermis a primární kůry. Světelný signál byl pozorován na plazmatických membránách buněk těchto vrstev. S maturací kořene signál anti-HvPht1;1,2 zůstával patrný především v povrchových vrstvách kořene. V $\frac{1}{4}$ délky byl pozorován pouze v rhizodermis a distální části buněk hypodermis. V $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ nebyl patrný žádný signál (Obr. 13 A – F, 14 A, B). Histochemickým barvením byly CP v exodermis detekovány až v $\frac{1}{2}$, SL byly lehce patrné také v $\frac{1}{2}$, avšak ve $\frac{3}{4}$ již pozorovány nebyly (Obr. 15 A – F, 16 A, B).

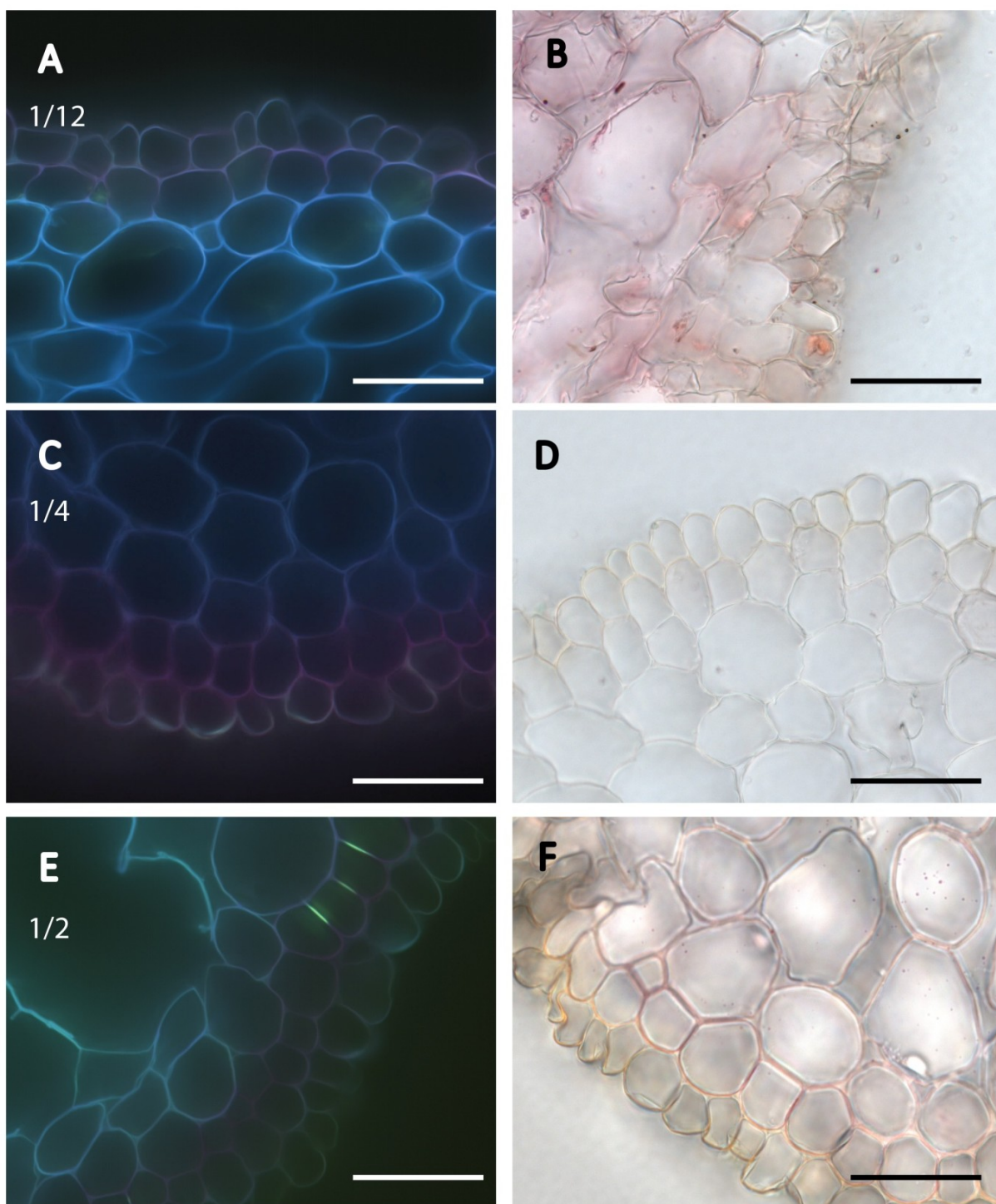
Tato redistribuce transportérů nicméně nebyla pozorována vždy. U jednoho z nezávisle odebraných kořenů byl signál viditelný jak v primární kůře, tak v rhizodermis ve všech různě starých vrstvách kořene kromě $\frac{1}{2}$, kde nebyl signál žádný. První CP se u tohoto kořene objevily již v $\frac{1}{4}$.



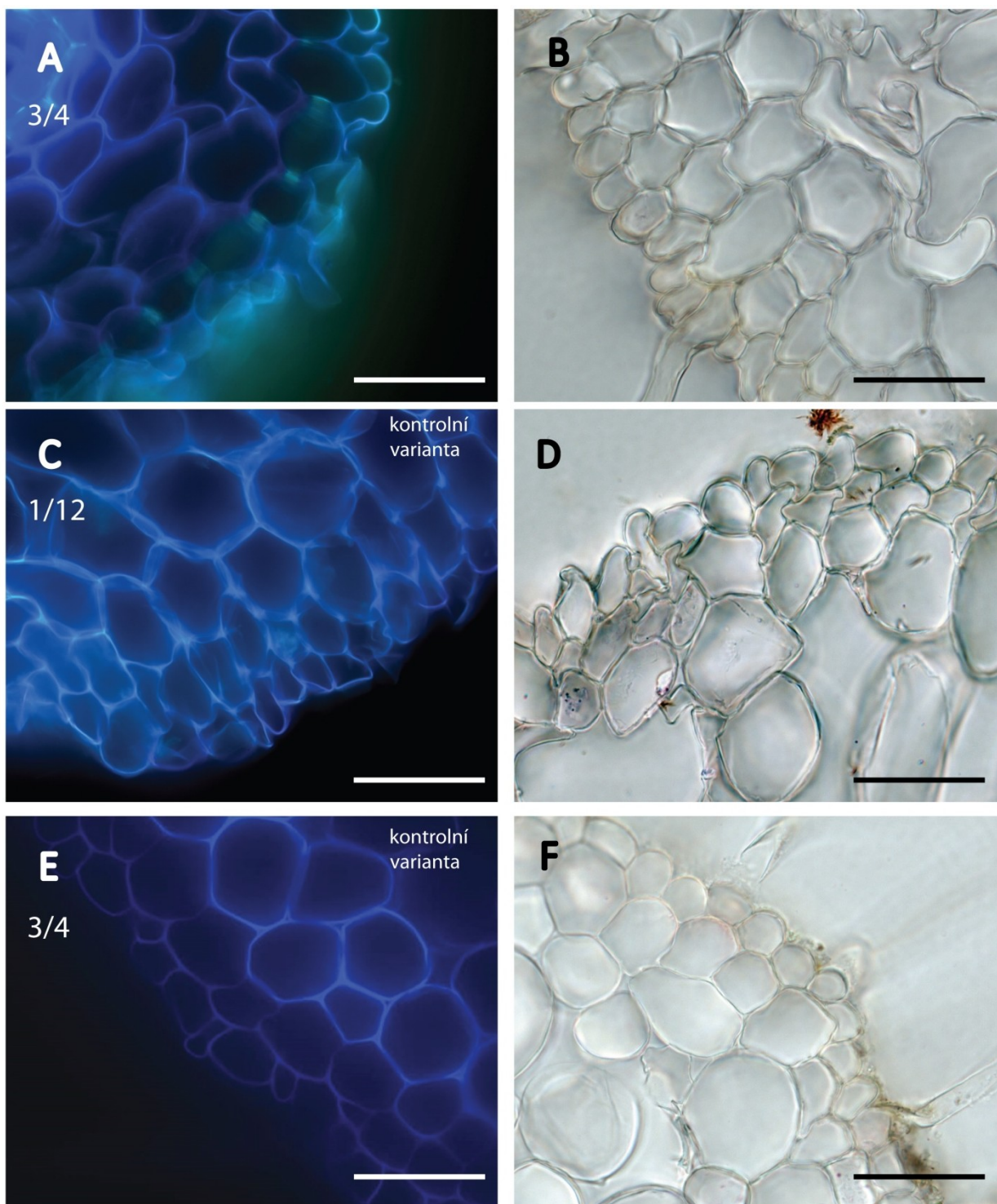
Obrázek 13 A, C, E: Imunodetekce HvPht1;1, 2 v různě starých částech kořene – $1/12$, $1/4$ a $1/2$ délky kořene od špičky (primární protilátka: Anti-HvPht1,1-2; sekundární protilátka: DyLight 488). B, D, F – negativní kontrola nespecifické vazby sekundární protilátky na řezech z identické pozice jako A, C, E imunodetekcí bez použití primární protilátky; barveno genciánovou violetí, WB; měřítko odpovídá 50 μm .



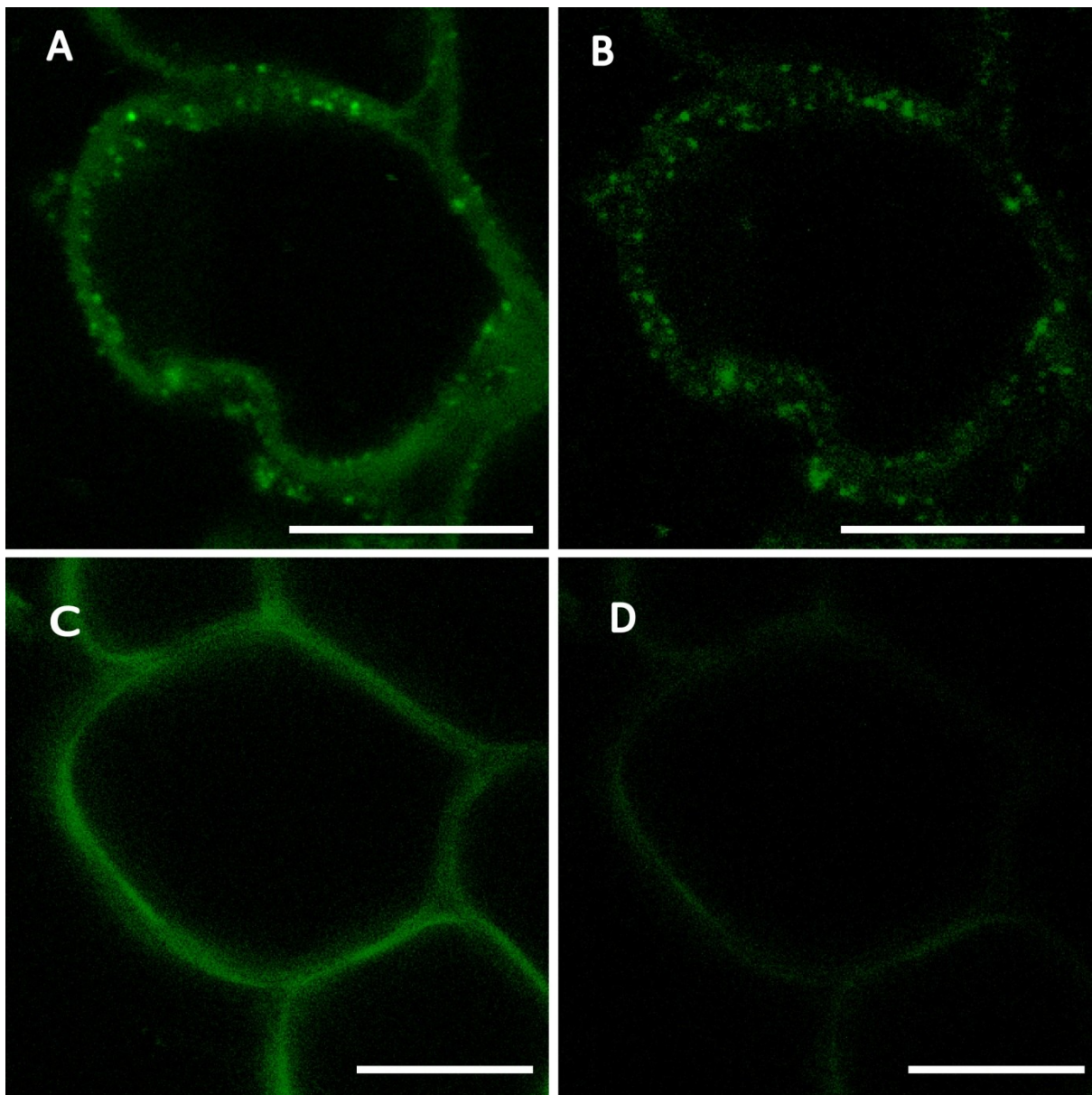
Obrázek 14 A, C, E: Imunodetekce HvPht1;1, 2 (primární protilátka: Anti-HvPht1,1-2; sekundární protilátka: DyLight 488); A, B – $\frac{3}{4}$ délky kořene, deficientní varianta; C – F – kontrolní varianta, $\frac{1}{12}$ a $\frac{3}{4}$ délky kořene od špičky. B, D, F – negativní kontrola nespecifické vazby sekundární protilátky na řezech z identické pozice jako A, C, E bez použití primární protilátky; barveno genciánovou violetí, WB; měřítko odpovídá 50 μm .



Obrázek 15 A – F: Histochemické barvení apoplastických bariér v $\frac{1}{12}$, $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ délky kořene od špičky; A, C, E – Casparyho proužky (barveno berberinem a genciánovou violetí, UV); B, D, F – suberinové lamely (barveno Sudanem Red 7B, světlé pole); měřítko odpovídá 50 μm



Obrázek 16 A – F: Histochemické barvení apoplastických bariér. A, B - $\frac{3}{4}$ délky kořene, deficientní varianta; C – F – kontrolní varianta, $\frac{1}{12}$ a $\frac{3}{4}$ délky kořene od špičky. A, C, E – Casparyho proužky (barveno berberinem a genciánovou violetí, UV); B, D, F – suberinové lamely (barveno Sudanem Red 7B, světlé pole); C-F – kontrolní varianta; měřítko odpovídá 50 μm



Obrázek 17: Ověření specificity imunodetekce (primární protilátka: Anti-HvPht1,1-2; sekundární protilátka: DyLight 488) metodou FLIM; A, B – imunodetekce za přítomnosti primární i sekundární protilátky; C, D – negativní kontrola - imunodetekce bez zařazení primární protilátky; B, D – odstranění signálu buněčné stěny pomocí gatingu (1,75 - 12 ns); barveno genciánovou violetí; emise snímána v rozmezí 495 – 579 nm; měřítko odpovídá 10 μm .

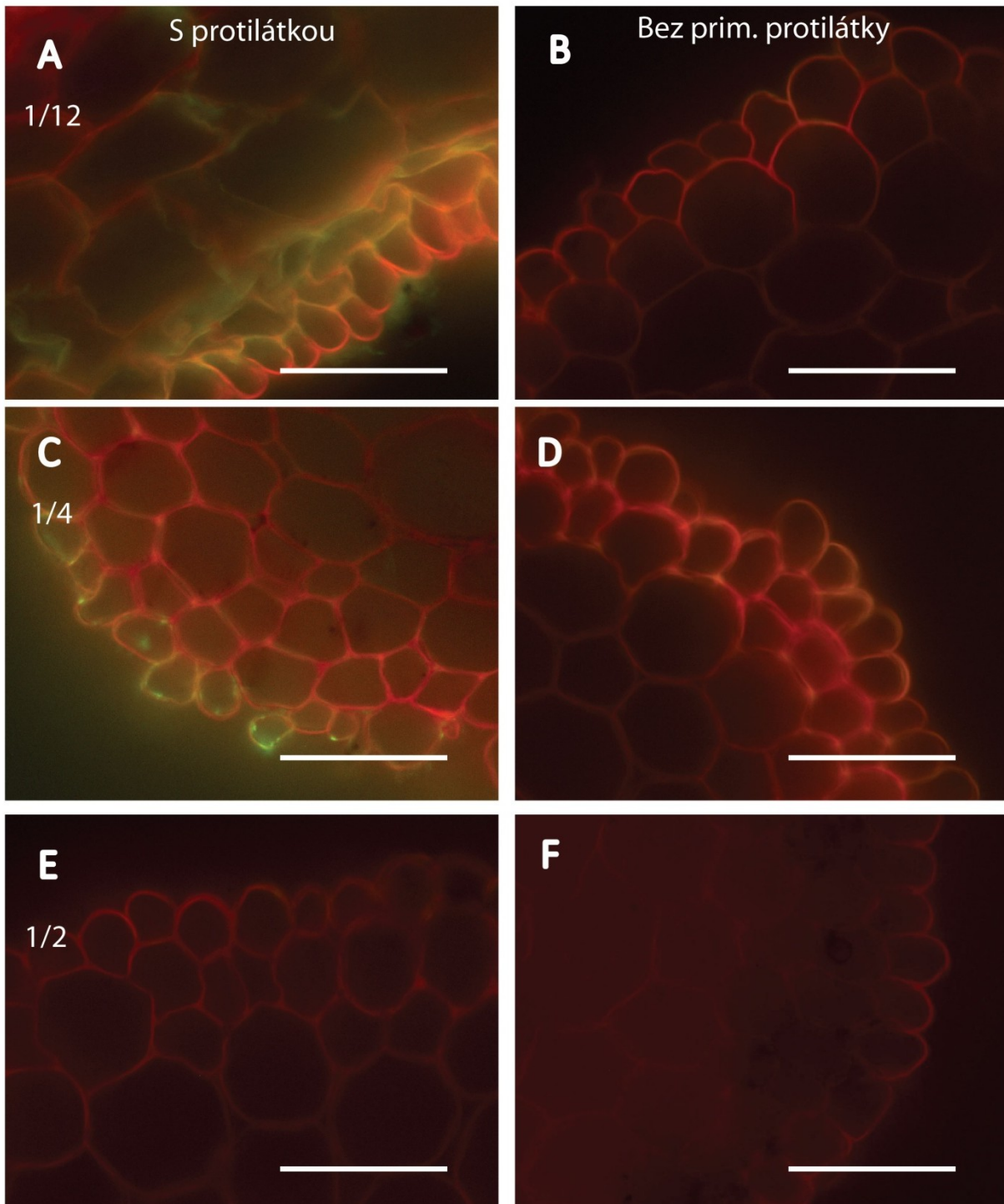
4.4. Lokalizace fosfátových transportérů v kořenech rostlin vystavených deficienci P (21 dní v 10 μ M P) – Experiment 4

Tento experiment probíhal totožně jako předchozí, avšak s rozdílem v množství P v kultivačním roztoku. Rostliny rostly po celou dobu experimentu v deficientním roztoku s 10 μ M P. Cílem bylo zjistit, zda přítomnost nízké koncentrace fosfátu po celou dobu kultivace dokáže u rostlin vyvolat odlišnou reakci (z hlediska přítomnosti/lokalizace fosfátových transportérů HvPht1;1,2) na deficienci fosfátu než u rostlin v Experimentu 3. I v případě tohoto experimentálního uspořádání byla pozorována redistribuce transportérů v rámci kořene. V primární kůře byl signál pozorován pouze v nejmladší části kořene, odkud následně vymizel. V povrchových vrstvách signál přetrval do $\frac{1}{4}$ délky kořene, až později také úplně vymizel (Obr. 18), avšak ve $\frac{3}{4}$ byl pozorován signál protilátky u jednotlivých buněk rhodermis (Obr. 20). Přítomnost SL ani CP nebyla do $\frac{1}{2}$ (včetně) detekována (Obr. 19 a 21). Ve $\frac{3}{4}$ bylo pozorováno pár vznikajících CP v exodermis, SL nikoliv (Obr. 20). U kontrolní varianty proběhl pouze rozbor apoplastických bariér a to v $\frac{1}{12}$ a $\frac{1}{4}$, kde nebyly pozorovány exodermální CP ani SL.

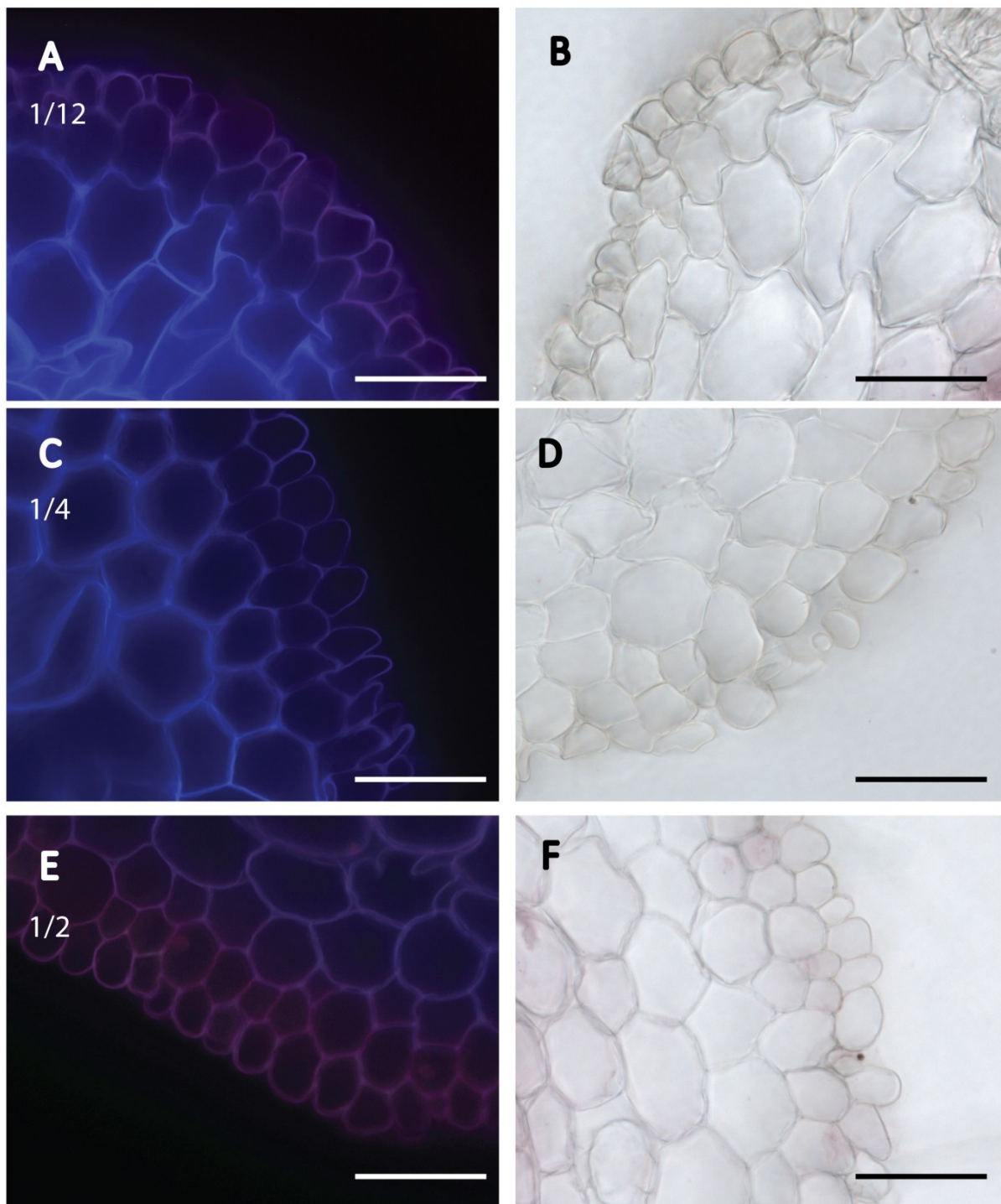
Tyto preparáty byly také snímány pomocí konfokálního mikroskopu, což pomohlo detailněji odlišit signál protilátky a autofluorescence buněčných stěn. Dle výsledků této snímací metody byla potvrzena redistribuce fosfátových transportérů pozorovaná ve fluorescenčním mikroskopu, avšak s drobným rozdílem. Lehce patrný signál byl v pokožce a primární kůře i ve starších částech kořene (Obr 23).

4.4.1. Pásková plazmolýza

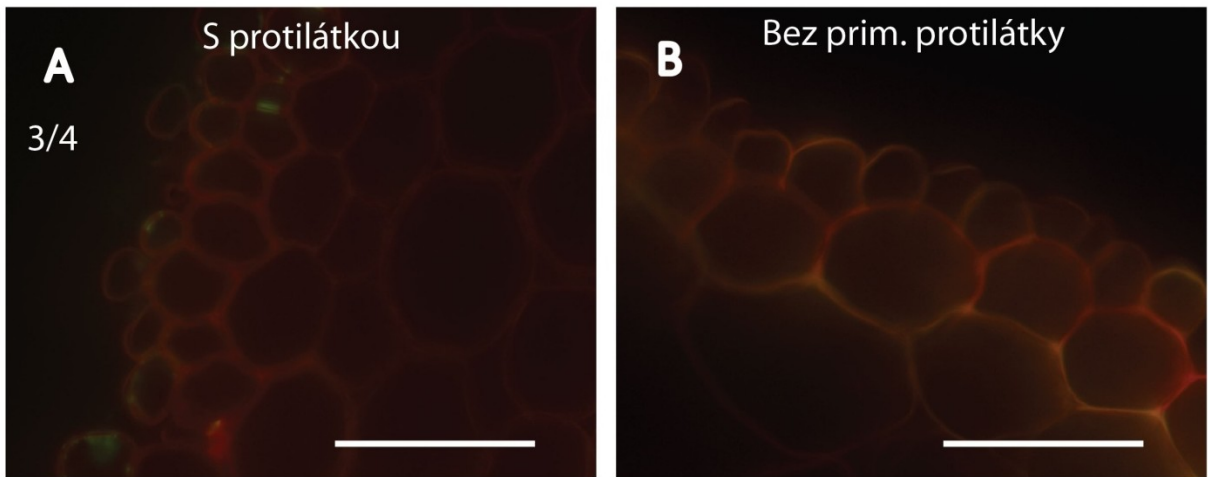
U tohoto experimentu bylo také snahou zjistit stav vývoje exodermis pomocí detekce přítomnosti páskové plazmolýzy na řezech segmenty kořenů, které byly krátce vystaveny působení hyperosmotického roztoku, avšak pro ucelený soubor informací je zapotřebí provést detailnější analýzu. Získané pilotní výsledky naznačují možnou adhezi plazmatické membrány k buněčné stěně dříve, než jsme schopni detekovat lignifikované CP (Obr. 22).



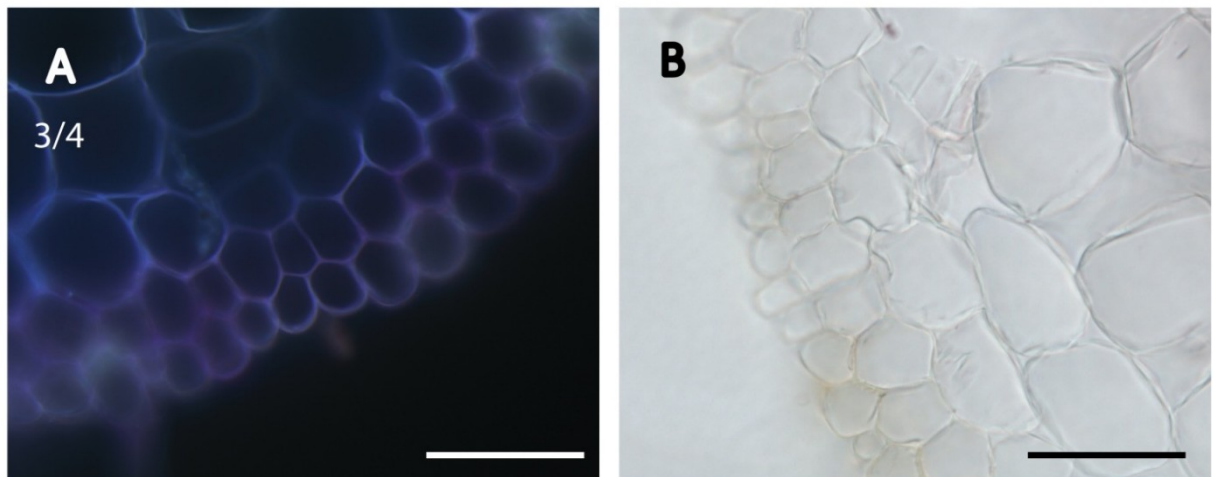
Obrázek 18 A, C, E: Imunodetekce HvPht1;1, 2 v různě starých částech kořene – $1/12$, $1/4$ a $1/2$ délky kořene od špičky (primární protilátka: Anti-HvPht1,1-2; sekundární protilátka: DyLight 488). B, D, F – negativní kontrola nespecifické vazby sekundární protilátky na řezech z identické pozice jako A, C, E imunodetekcí bez použití primární protilátky; barveno genciánovou violetí, WB; měřítko odpovídá 50 μm .



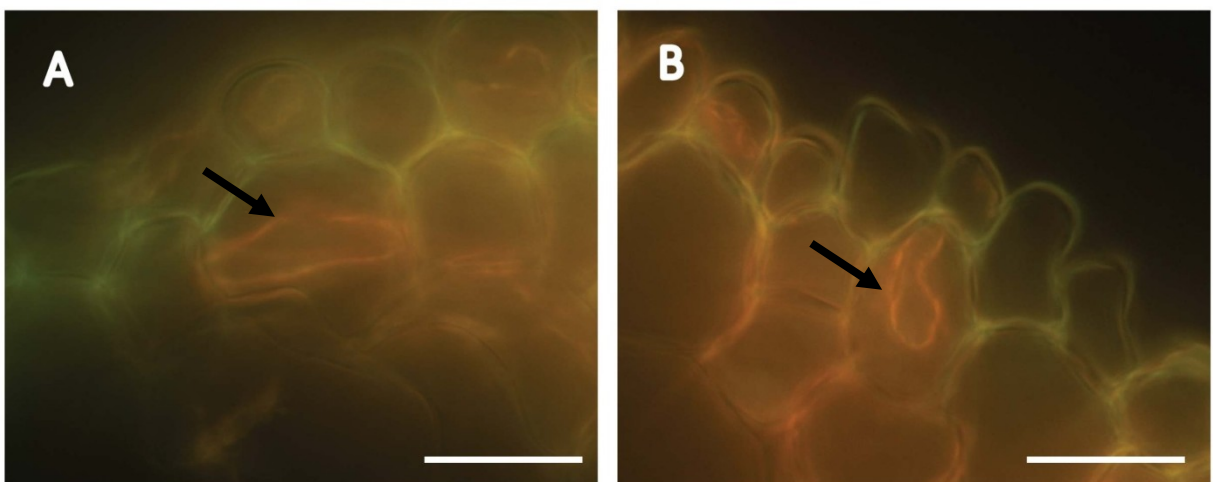
Obrázek 19: Histochemické barvení apoplastických bariér; A, C, E – Caspariho proužky (barveno berberinem a genciánovou violetí, UV); B, D, F – suberinové lamely (barveno Sudanem Red 7B, světlé pole); měřítko odpovídá 50 µm.



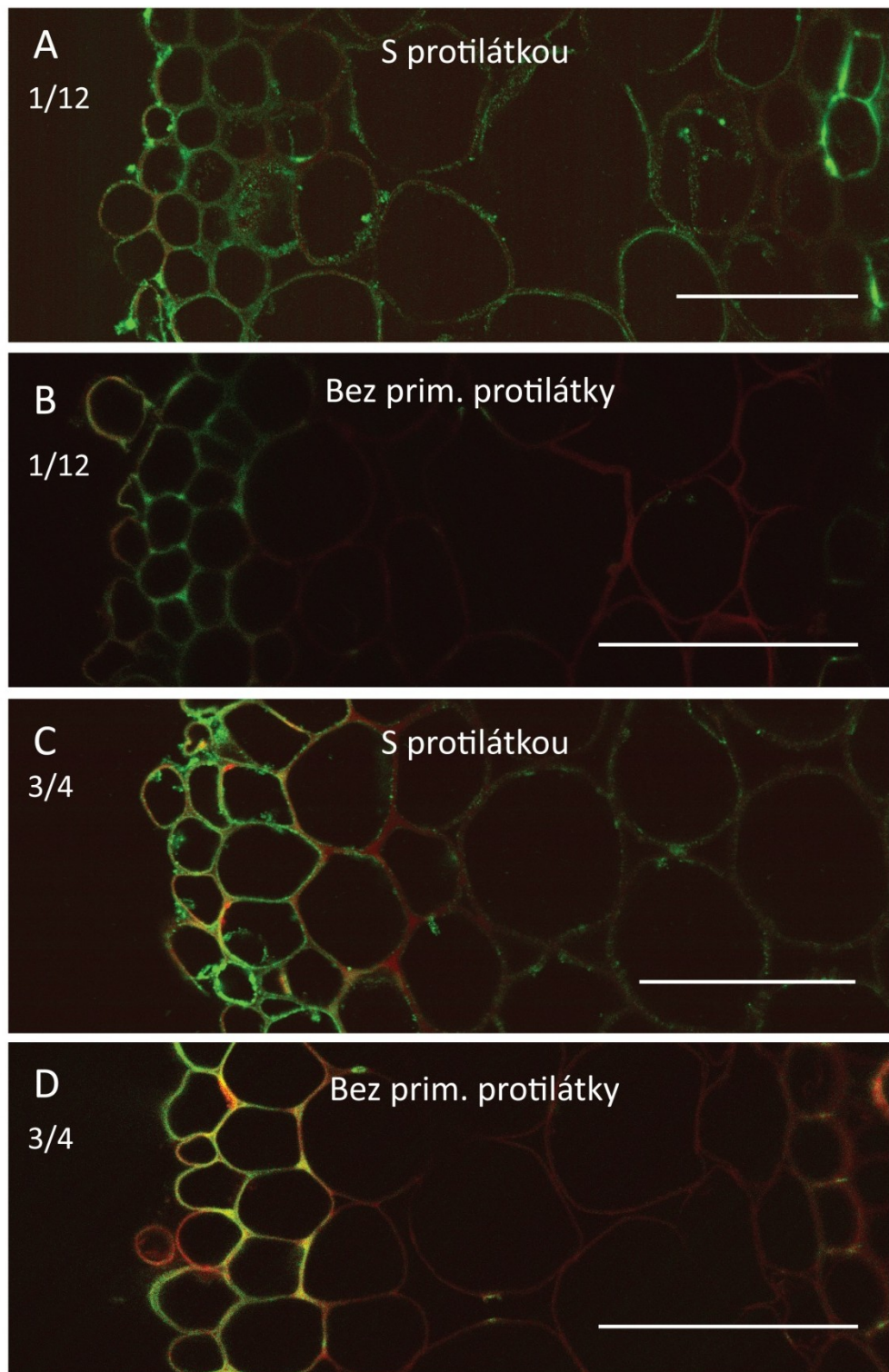
Obrázek 20 A: Imunodetekce HvPht1;1, 2 (primární protilátka: Anti-HvPht1,1-2; sekundární protilátka: DyLight 488); $\frac{3}{4}$ délky kořene, deficientní varianta. B – negativní kontrola nespecifické vazby sekundární protilátky bez použití prim. protilátky, řez z identické pozice jako A; barveno genián. violetí, WB; měřítko odpovídá 50 μm .



Obrázek 21: Histochemické barvení apoplastických bariér; A – Casparyho proužky (barveno berberinem a genián. violetí, UV), B – suberinové lamely (barveno Sudanem Red 7B, světlé pole); měřítko odpovídá 50 μm .



Obrázek 22: Plazmolýza; A – pásková plazmolýza hypodermální buňky; B – běžná plazmolýza hypodermální buňky (barveno FM4-64, WB); šipky ukazují na protoplast; měřítko odpovídá 25 μm .



Obrázek 23 A – D: Snímky z konfokálního mikroskopu z $1/12$ a $3/4$ délky kořene ze stejných řezů jako na obr. 18 a obr. 20.; A, C – Imunodetekce HvPht1; 1, 2 v $1/12$ a $3/4$ délky kořene od špičky (primární protilátka: Anti-HvPht1,1-2; sekundární protilátka: DyLight 488); B, D – negativní kontrola bez použití primární protilátky na řezech z identické pozice jako A, C; měřítko odpovídá 50 μm .

4.5. Transformace rýže (*Oryza sativa*) – translační fúze

pOsLsi1::OsLsi:GFP

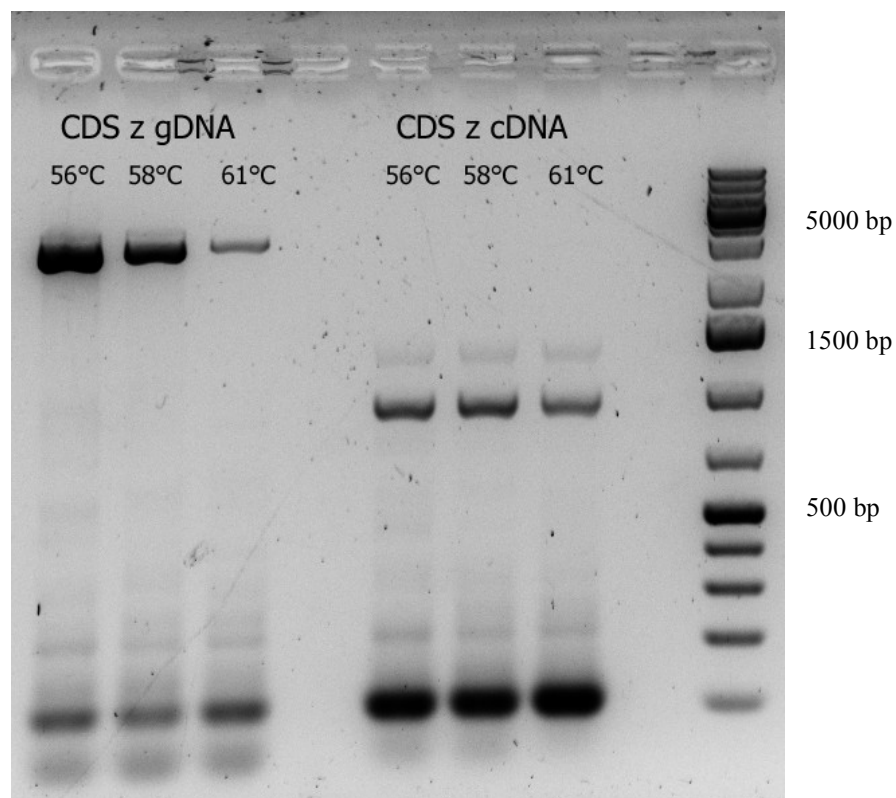
4.5.1. Příprava konstruktů

Tento experiment byl zařazen za účelem přípravy rostliny nesoucí translační fúzi GFP se transportérem křemíku, který zajišťuje vstup kys. křemičité do buněk. Detailní sledování jeho lokalizace by mohlo přinést odpověď na otázku, jak se přítomnost transportéru na membráně endodermální/exodermální buňky mění s počátkem ukládání suberinové lamely, neboť bylo pro tento transportér popsáno, že je lokalizován právě na úrovni apoplastických bariér (Ma et al., 2006). V rámci tohoto experimentu bylo také zaváděna nová metodika (transformace rýže) v laboratoři fyziologické anatomie.

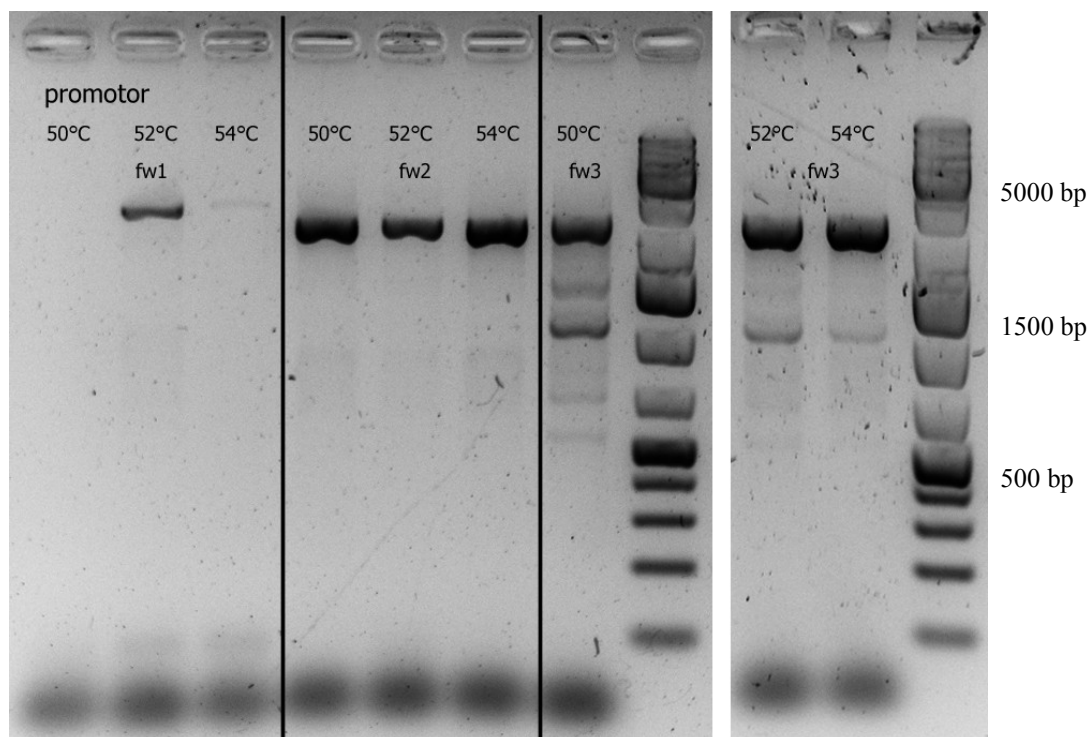
Během toho experimentu byla úspěšně amplifikována kódující sekvence genu *Lsi1* z gDNA i cDNA (Obr. 24) a obě sekvence byly klonovány do vektoru pDONOR 221. Úspěšnost klonování potvrdila kontrolní restrikce i následná sekvenace (obr. 26). Problém nastal při amplifikaci promotorové oblasti *OsLsi1*. Bylo otestováno několik různých primerů (připravených pomocí programu Geneious 8.1.9, viz tabulka 7) k tomuto promotoru, avšak žádný z nich nepřinesl požadovaný výsledek. V některých případech nebyla úspěšná samotná amplifikace, opakovaně ale byly získány produkty odpovídající délky (Obr. 25). Ty byly klonovány do pDONOR P4P1r nebo pENTR 5'-TOPO vektoru (podle použitých primerů). Kontrolní restrikce nebo sekvenace izolovaného plazmidu však vždy ukázala, že byl klonován nesprávný úsek DNA. Tudíž druhá část MultiSite gateway metody – LR reakce nebyla provedena.

4.5.2. Testovací transformace pomocí *Agrobacterium* nesoucím konstrukt s volným GFP

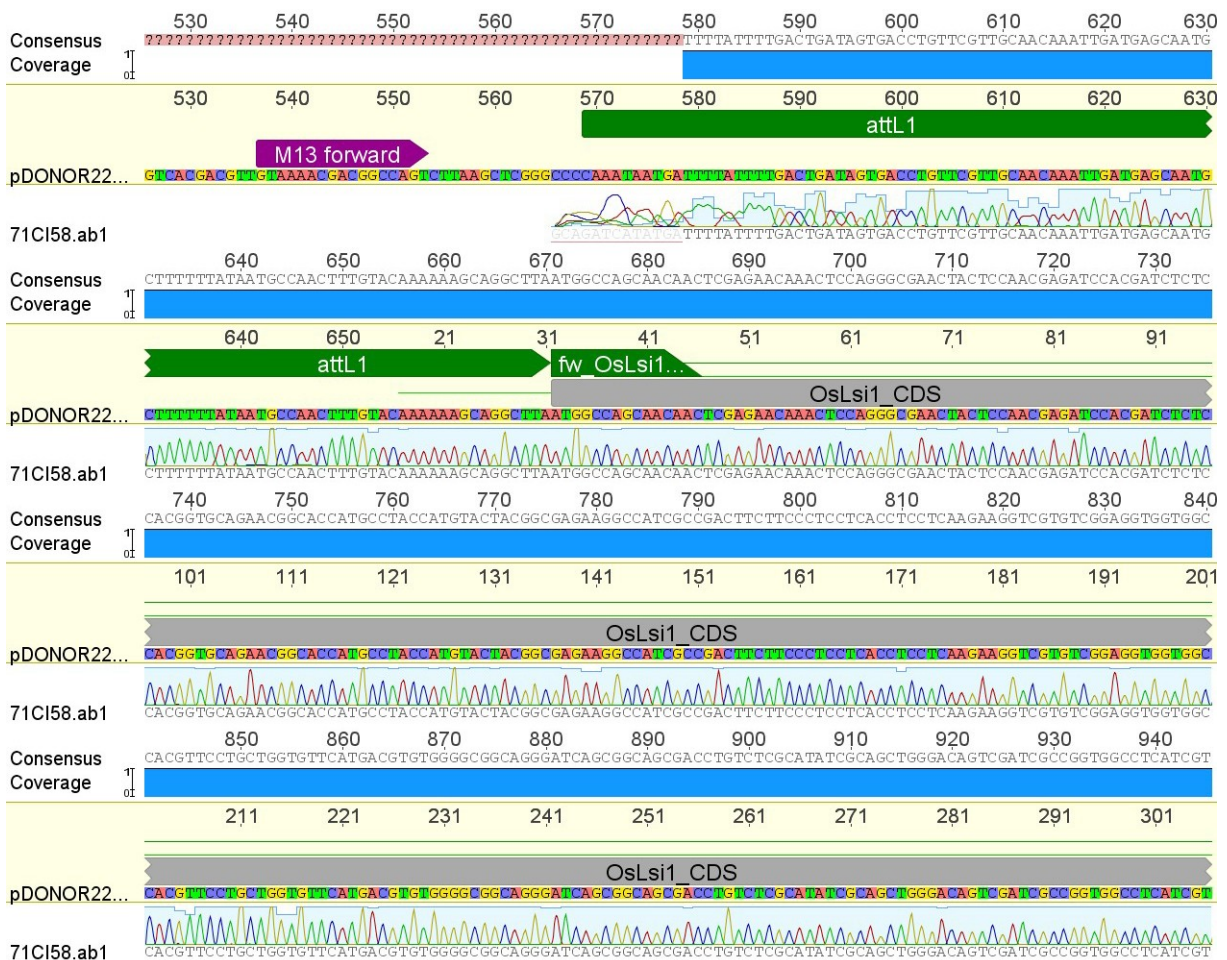
Vzhledem k problémům s přípravou promotorového konstruktu byla za účelem otestování a optimalizace postupu transformace rýžových kalusů provedena zkušební transformace pomocí *Agrobacterium* (kmen C58C1) nesoucí konstrukt pCP60 s volným GFP (připravil Mgr. Tyč; viz diplomová práce Tyč, 2011). Kalusy se podařilo transformovat (Obr. 27), avšak regenerovat z kalusu rostliny již nikoliv.



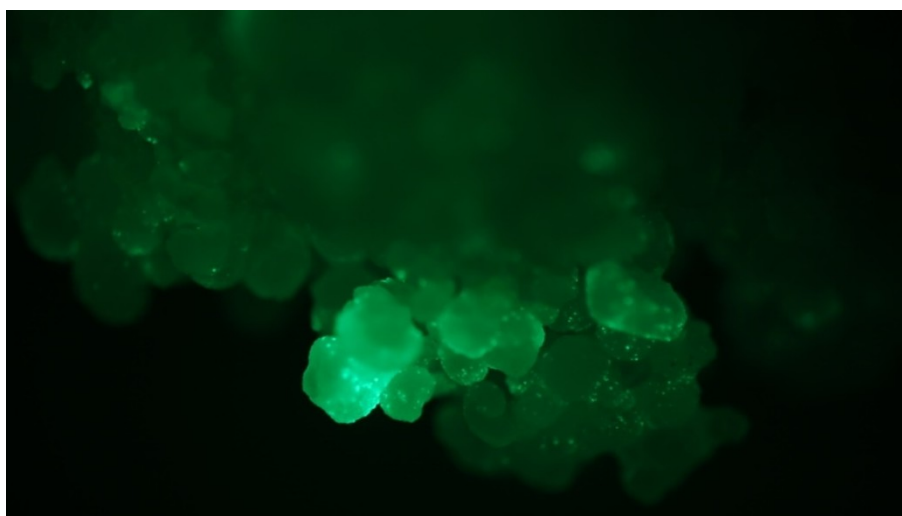
Obrázek 24: Produkty amplifikace kódující sekvence (cds) genu *OsLsi1* pro klonování do vektoru pDONOR 221; použité primery viz Tab. 7; amplifikace provedena 3x s různou teplotou nasedání primerů - použité teploty jsou uvedeny v obrázku; žebříček 1 kb plus



Obrázek 25: Produkty amplifikace promotoru genu *OsLsi1* pro klonování do vektoru pENTR 5' TOPO; použity tři různé forward primery (fw – fw3) dle Tab. 7; amplifikace pro každou kombinaci primerů provedena 3x s různou teplotou nasedání primerů během PCR reakce - teploty jsou uvedeny v obrázku; žebříček 1 kb plus



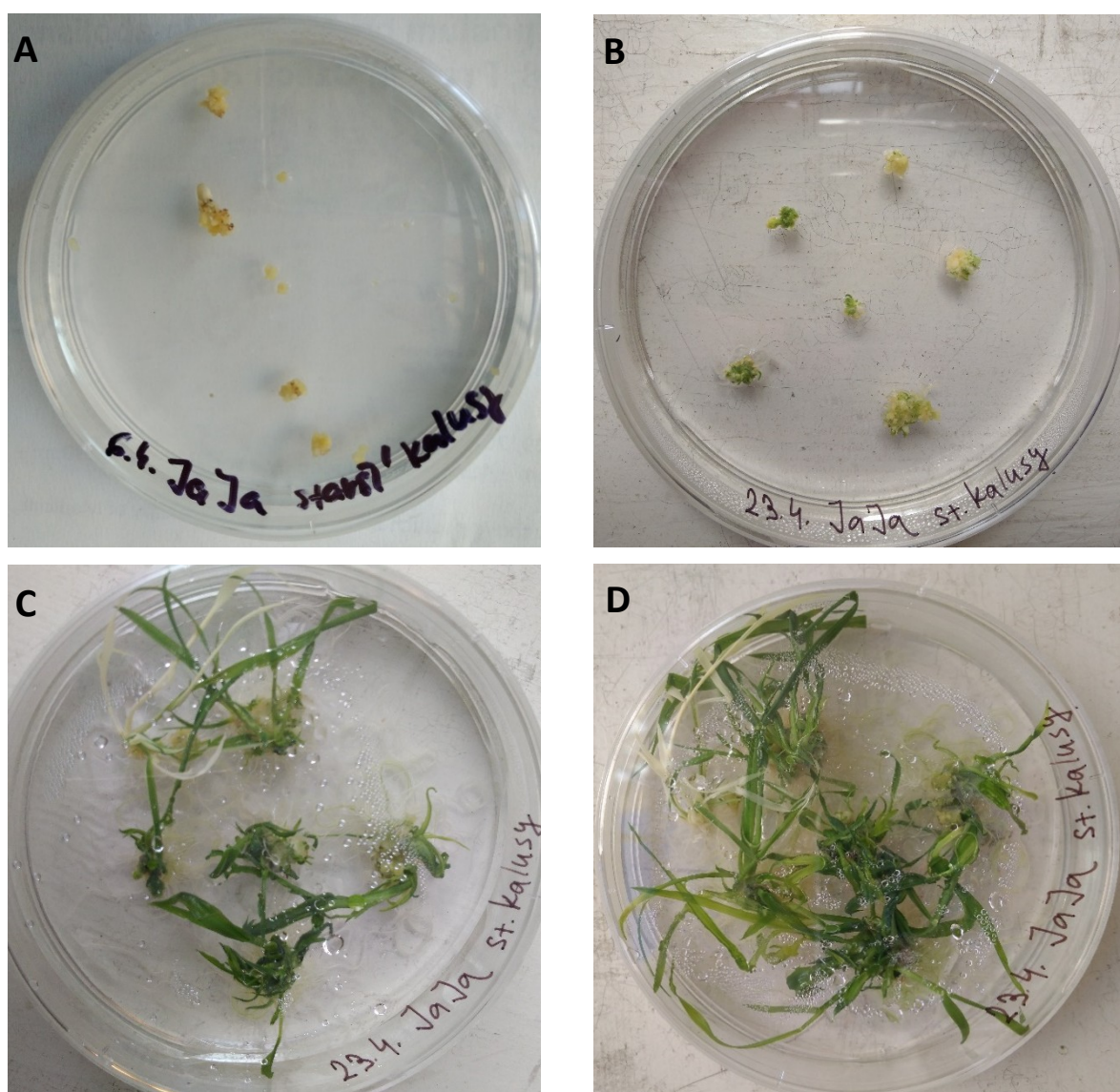
Obrázek 26: Část výsledku kontrolní sekvenace vektoru pDONOR 221 se zaklonovanou kódující sekvencí genu *Lsi1*; pro sekvenaci byl použit M13 forward primer (fialově). Patrné je zde attL1 místo vektoru (označeno zeleně) a počátek kódující sekvence *OsLsi1* (*OsLsi1_CDS*, označeno šedě) a . Řádek 71CI58.ab1 – výsledek sekvenace; pDONOR221 - in-silico připravená sekvence výsledného konstrukt; modrá barva označuje shodu mezi sekvencemi. Exportováno z programu Geneious 8.1.9.



Obrázek 27: Rýžový kalus transformovaný pomocí *Agrobacterium* (kmen C58C1) nesoucí konstrukt pCP60 s volným GFP. Je zde patrný okřesek transformovaných buněk, které obsahují GFP; snímáno binolupou s fluorescencí (WB).

4.5.3. Příprava kalusu a regenerace rostlin

Tato část metody byla prakticky zvládnuta a optimalizována. V tomto případě byla vynechána pasáž infekce pomocí *Agrobacterium*. Práce tedy probíhala s kalusy, které neprošly transformací. Jelikož semínka 18 dnů po vysazení na iniciační médium (dle Main et al. 2015) vykazovala minimální růstové změny, byla přesazena na nové médium s dvojnásobným množstvím 2,4 – D. Na tomto médiu začala kalogeneze, která probíhala 22 dnů. Poté byly kalusy přeneseny na regenerační médium I. Po 18 dnech byly kalusy s rostlinami přesazeny na regenerační médium II (Obr. 28). Po cca 14 dnech byly rostliny schopny přesazení ex – vitro, což však již nebylo z časových důvodů provedeno.



Obrázek 28: Kalusy na regeneračním médiu I. a II., postupující doba kultivace. A– tři týdny staré kalusy při přesazení na regenerační médium I, B– počínající regenerace rostlin z kalusů po 17 dnech na regeneračním médiu I, přenos na regenerační médium II, C – kalusy po 27 dnech kultivace na regeneračním médiu II, D – kalusy po 32 dnech kultivace na regeneračním médiu II

5. Diskuze

5.1. Vliv nedostatku P na růst rostlin a utváření exodermis v kořenech ječmene

Za účelem charakterizovat vliv nedostatku P na růst rostlin a postup diferenciaci exodermis v kořenech (a případnou korelaci mezi těmito faktory) bylo testováno celkem šest kultivarů ječmene – jarní: Arthur, Solist a ozimé: Henriette, Sylva, Lancelot, Titus. Byly provedeny hydroponické kultivace v kontrolním roztoku a roztoku deficientním na fosfor. Kontrolní rostliny byly pěstovány v Hoaglandově roztoku (Hoagland a Arnon, 1950) zředěném na $\frac{1}{4}$ koncentraci s přidavkem mikroprvků. Koncentrace PO_4^{3-} v tomto roztoku dosahuje $254\mu\text{M}$. Tato koncentrace by měla být optimální pro růst a vývoj rostlin (Laštůvka a Minář, 1967). Ve variantě deficientní na fosfor byl po dobu 14 dní z roztoku PO_4^{3-} úplně odebrán ($0\mu\text{M}$) a obsah K^+ byl dorovnán na hodnotu odpovídající $\frac{1}{4}$ Hoaglandu přidáním K_2SO_4 .

5.1.1. Růstová odpověď jednotlivých kultivarů na nedostatek P

Deficience živin má vliv na vývoj rostlin v různých aspektech. Nedostatek fosforu se obecně projevuje například sníženým počtem listů a jejich tmavým zbarvením, menší listovou plochou, zvýšením poměru R/S, sníženou účinností fotosyntézy, změnami v morfologii kořenového systému, omezením tvorby reprodukčních orgánů atd. (Marschner, 1995). Není proto překvapující, že se i v případě našich kultivací nedostatek fosforu projevil napříč mezi kultivary celkovým snížením tvorby biomasy nadzemní i podzemní části. Jak délka, tak suchá hmotnost prýtů byla v deficienci snížena. Co se týče kořenového systému a jeho odpovědi na deficienci P, zde kultivary reagovaly odlišně. V případě první kultivace kultivary Solist a Henriette v deficientní variantě výrazně převyšovaly délkou svých kořenů ostatní kultivary, neboť oproti kontrolní variantě své kořeny prodloužily. Opačný trend byl naopak patrný u kultivaru Arthur, který v deficientních podmínkách dokázal vytvořit jen krátký kořenový systém, výrazně kratší než v kontrolních podmínkách. Vzhledem k těmto zajímavým rozdílům v růstové reakci mezi kultivary v první kultivaci byla provedena druhá kultivace s větším počtem opakování. Tato detailnější kultivace však růstové trendy z první kultivace potvrdila jen ve velmi omezené míře. V případě druhé kultivace totiž nebyly rozdíly mezi kultivary nijak výrazné.

Některé trendy se nicméně opakovaly v obou kultivacích. Jarní kultivary Arthur a Solist vykazovaly v obou kultivacích i obou variantách kultivace delší prýty, což souvisí se strategií jejich životního cyklu. Z jednotlivých kultivarů je možno zmínit ozimý kultivar Sylva, jenž opakovaně na deficienci reagoval vytvořením velkého množství krátkých kořenů a vykazoval vysoký R/S poměr. V řadě případů však byly růstové trendy v obou kultivacích rozdílné. Např. kultivar Henriette převyšoval v první kultivaci v deficientní variantě celkovou biomasou ostatní kultivary a měl velmi dlouhý kořenový systém, zatímco v kontrolní variantě byl druhý nejmenší. V druhé kultivaci (deficientní) nebyly mezi kultivary rozdíly v celkové biomase, ani délkou kořenů kultivar Henriette nepřevyšoval ostatní kultivary, měl však nejkratší prýt.

Rozdílné výsledky mezi kultivacemi mohou být způsobeny malým počtem rostlin v první kultivaci, či tím, že během první kultivace sdílely dva různé kultivary jednu kultivační nádobu. Nyní probíhá třetí kultivace s obsahem $10\mu\text{M}$ P v kultivačním roztoku, která dle předběžného pozorování spíše potvrdí výsledky druhé kultivace, avšak výsledky této kultivace nebudou v této práci zařazeny.

Dostupnost fosfátu bývá častým problémem mnohých obhospodařovaných půd, kdy se k jeho doplnění používají hnojiva. Efektivita hnojení je často velmi nízká a dochází tak k opačnému účinku, kdy nadbytek fosfátu v ekosystému má negativní dopad a způsobuje například eutrofizaci (Smith et al., 1999) a pokles diverzity ekosystémů (Ceulemans et al., 2013; Lambers et al., 2013). Řešením této problematiky by mohlo být pěstování kultivarů nejlépe přizpůsobených k růstu v deficienci, s kořenovým systémem schopným efektivně využít dostupný fosfor. Studie zabývající se vlivem deficiencie fosfátu na délku kořenů u čtyř jarních kultivarů ječmene v polních podmínkách v závislosti na výnos zrna dokládá, že výnos zrna byl ovlivněn délkou kořenů. Délka kořenů ovlivňuje množstvím přijatého P, tudíž kultivar s nejdelším kořenovým systémem přijal nejvíce P a byl tak nejvýnosnější (Schjørring a Nielsen, 1987). V jiné studii porovnávali morfologii kořenových vlásků dvou kultivarů z předchozí studie - nejvíce a nejméně výnosného kultivaru. Porovnávana byla hustota a délka kořenových vlásků. Více výnosný kultivar měl hustší a delší kořenové vlášení než druhý sledovaný kultivar při kultivaci v půdě i v hydroponii, avšak v hydroponické kultivaci nebyly zaznamenány rozdíly v množství přijatého P. Delší kořenové vlásky v půdě umožňují vyšší příjem dostupného P (Gahoonia a Nielsen, 1997). Tyto práce dokládají, že růstové parametry kořenového systému v deficientních podmínkách jsou důležitou charakteristikou ovlivňující příjem živin.

5.1.2. Diferenciace exodermis pod vlivem nedostatku P

Stresové faktory indukují dřívější formaci exodermis (Reinhardt a Rost, 1995; Stasovski a Peterson, 1993; Taleisnik, 1999), což bylo experimenty této diplomové práce potvrzeno. Stejně výsledky, tedy indukci diferenciace exodermis u kukuřice (*Zea mays*) deficiencí živiny (především dusíku) také zaznamenal kolega ze stejné laboratoře Jiří Namyslov. Exodermis funguje jako ochranná bariéra, avšak na příjem živin může mít zřejmě i negativní dopad.

Detekovatelné exodermální CP byly pozorovány již v $\frac{1}{2}$ délky kořene, zatímco u kontrolní varianty nebyly CP diferencovány ani ve $\frac{3}{4}$ délky (tj. v bazální části kořene). I v případě SL byl pozorován vliv deficiencie P, avšak až ve starší části kořene, tj. ve $\frac{3}{4}$, kdy kořeny deficientní varianty v určité míře dospěly do stádia SL, zatímco kontrolní varianty nikoliv (výjimečný výskyt SL u ojedinělých buněk jednoho kultivaru z kontrolní varianty mohl být způsoben aktuálním stavem rostliny či kultivačními podmínkami). Signifikantní vliv deficiencie na SL ve $\frac{3}{4}$ délky kořene byl také pozorován na úrovni endodermis, kdy deficientní varianta měla na rozdíl od kontrolní varianty endodermální vrstvu již téměř plně suberinizovanou. Korelace mezi délkou kořenového systému a stupněm diferenciace exodermis nebyla nalezena. Možno zmínit, že kultivary Sylva a Titus měly sice krátký, zato hustý kořenový systém a vykazovaly hojnější výskyt exodermálních CP. Titus také tvořil nejvíce SL. V obou sledovaných pozicích, tj. v $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ délky kořene, měly tyto dva kultivary spolu s kultivarem Henriette, který měl naopak dlouhé kořeny, nejvíce diferencovanou exodermis. Kultivar Lancelot měl v $\frac{1}{2}$ nejméně CP, avšak ve $\frac{3}{4}$ se vyrovnal četností CP i SL kultivaru Arthur.

I přes jednoznačný vliv deficiencie P na indukci tvorby exodermis, pozorovaný v této práci, nám není známa konkrétní studie zabývající se tímto tématem. Existují nicméně studie zabývající se vlivem deficiencie živin na množství uloženého suberinu v apoplastických bariérách. Například autor Pouzelo (1984) pozoroval při deficienci hořčíku zvýšené ukládání suberinu v endodermis i exodermis u kořene kukuřice (*Zea mays*), což koreluje s našimi výsledky, kdy ve $\frac{3}{4}$ délky kořene byla u deficientních rostlin pozorována větší uzavřenost endodermis suberinovými lamelami než v kontrolním roztoku. V této práci se autor a kolektiv nezabývali místem uložení prvních suberinových lamel, pouze mírou suberinizace v konkrétních pozicích. Další studie zabývající se vlivem nedostatku N a salinity na obsah suberinu v apoplastických bariérách skočce (*Ricinus communis* L.) pozoruje naopak snížení obsahu suberinu při deficienci N, zatímco v případě salinity jeho nárůst (Schreiber et al., 2004). Toto pozorování nebylo potvrzeno prací provedenou na kukuřici (*Zea mays*), v níž

autor pozoroval zesílení suberinizace endodermis při deficienci NO_3 a tím pádem nižší průtok vody kořenem. Naopak méně suberinu v CP a současně zvýšení průtoku vody kořenem bylo pozorováno při deficienci draslíku (Schraut, 2005). Tentýž autor popisuje snížení hydraulické vodivosti kořene v případě deficiencie S a P (Clarkson et al., 2000; Radin a Matthews, 1989). Recentní studie provedená na *Arabidopsis thaliana* potvrzuje vliv deficiencie na ukládání suberinu v endodermis, avšak v případě nedostatku K^+ pozorovali její zvýšenou suberinizaci. V případě nedostatku železa, manganu a zinku došlo k poklesu ukládání suberinu (Barberon et al., 2016a). Regulační roli v rámci suberinizace hrají též fytohormony. Při působení ethylénu bylo pozorováno snížení suberinizace, naopak při aplikaci ABA její indukce (Boher et al., 2013; Cottle a Kolattukudy, 1982). Nejen deficiencie, ale naopak i vyšší koncentrace některých živin v půdě ovlivňuje ukládání suberinu. Potvrzení nárůstu suberinizace vlivem zvýšené koncentrace solí v půdě přinesla studie porovnávající tři kultivary rýže různě odolných vůči salinitě. Po týdnu působení solného stresu došlo ke zvýšení obsahu suberinu v apoplastických bariérách u všech kultivarů. Odolný kultivar měl však exodermis více diferencovanou i v mladších částech kořene, a i v optimálních podmínkách (Krishnamurthy et al., 2009).

Plasticita reakce rostlin může být způsobena vlivem deficiencie či nadbytkem konkrétní živiny v závislosti na množství, ve kterém ji rostlina potřebuje či samotným druhem rostliny a jejími potřebami. V této práci byla pozorována indukce tvorby exodermis deficiencí P zřejmě za účelem omezení ztrát již přijatého fosfátu.

5.2. Vliv diferenciac exodermis na lokalizaci membránových transportérů fosfátu v primární kůře

Ve snaze zjistit vliv diferenciac exodermis na příjem a radiální transport živin byly provedeny pokusy imunodetekce pomocí protilátky k fosfátovému transportéru HvPht1;1,2. Otázkou bylo, jakým způsobem ovlivňuje přítomnost exodermis zapojení buněk primární kůry v příjmu a transportu živin, tj. zda se budou na membránách buněk primární kůry tyto transportéry vyskytovat i po diferenciaci exodermálních CP.

5.2.1. Imunodetekce fosfátových transportérů

Pro tyto experimenty byl vybrán kultivar Henriette (*H. vulgare* cv. Henriette), který jak ve $\frac{3}{4}$, tak i v $\frac{1}{2}$ délky kořene tvořil exodermální CP a v menší míře i SL. Transportéry HvPht1;1,2 se

řadí mezi vysokoafinitní (Schunmann, 2004), z čehož lze předpokládat jejich výskyt u rostlin pěstovaných za nízké koncentrace fosfátu v prostředí. Kultivar Henriette byl proto před imunodetekcí HvPht1;1,2 kultivován nejenom v kompletním živném roztoku, ale byl také vystaven po určitou dobu nedostatku P ve dvou kultivačních schématech. V jednom případě byly rostliny pěstovány týden v kompletním živném roztoku a následně byly na dva týdny převedeny do roztoku s obsahem $0\mu\text{M}$ P. Druhá kultivace se lišila způsobem navození deficiencie, kdy rostliny po celou dobu kultivace, tj. tři týdny rostly v živném roztoku o obsahu $10\mu\text{M}$ P. V souladu s předpokládanou funkcí HvPht1;1,2 byl signál protilátky pozorován především u rostlin z P deficientních kultivací (0 nebo $10\mu\text{M}$ P). U rostlin pěstovaných v kontrolním roztoku byl světelný signál zaznamenán pouze v rámci jedné kultivace, kdy byl pozorován signál několika málo buněk v $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ délky kořene. To mohlo být způsobeno aktuálním stavem rostliny. Metoda imunodetekce byla vždy korelována s histochemickým barvením apoplastických bariér. V kontrolních variantách nebyla diferenciace exodermis pozorována v žádném z analyzovaných kořenů.

Ve dvou úspěšných případech imunodetekce byla pozorována změna distribuce membránových fosfátových transportérů HvPht1;1, 2. Testována byla vždy $\frac{1}{12}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ délky kořene. V obou případech byla lokalizace transportérů HvPht1;1, 2 v nejmladších částech kořenů detekována na plazmatických membránách buněk rhizodermis a primární kůry, což odpovídá pozorování autora Schünmann a kolektivu (2004), kteří však tento signál pozorovali u transformované rýže, nesoucí translační fúzi HvPht1;1 nebo HvPht1;2 s GFP pod 35S promotorem. Jednalo se tedy o overexpresi obou genů. V našem případě se jednalo o skutečnou lokalizaci těchto transportérů v reálných podmínkách přímo v ječmeni. V $\frac{1}{4}$ délky kořene byl již signál patrný pouze u buněk rhizodermis nebo v distální části plazmatické membrány buněk hypodermis, přestože CP ani SL nebyly v tomto místě detekovány pomocí histochemického barvení. V $\frac{1}{2}$ se signál z buněk rhizodermis vytrácel či nebyl vůbec pozorován. Ve $\frac{3}{4}$ se v jednom případě signál u pár buněk objevil. Ve stejném místě byly pozorovatelné vznikající CP.

Z těchto výsledků je patrné, že redistribuce lokalizace fosfátových transportérů ječmene HvPht1;1, 2 je patrná, ale nekoreluje přesně s nástupem diferenciace exodermis. K redistribuci dochází dříve, než je diferenciace exodermis započata. To může být vysvětleno dvěma možnostmi. Jednou z možností je funkčnost CP v exodermis dříve, než je možné histochemickým barvením detekovat jejich lignifikaci. Funkčnost CP lze dokázat adhezí plazmatické membrány k buněčné stěně pomocí páskové plazmolýzy (Bonnett, 1968).

Druhou možností je neměnné vývojové nastavení rostliny, kdy příjem majoritně probíhá jen v nejmladších částech rostliny, které se dostanou do oblastí půdy s dostupným fosfátem, neboť fosfát je v půdě velice málo pohyblivý a dochází ke vzniku vyčerpaných oblastí (Brady and Weil, 2001).

V případě transportérů některých živin byla také pozorována změna jejich lokalizace s vývojem kořene, avšak bez přesné detekce apoplastických bariér. Například transportéry bóru mizí se stářím kořene z pokožkových vrstev u *Arabidopsis thaliana* a zůstávají na úrovni endodermis (Alassimone et al., 2010; Takano et al., 2010), u rýže mizí z rhizodermis a zůstávají pouze na úrovni exodermis, zřejmě v rámci koordinace pohybu látek mezi apoplastem a symplastem (Liu et al., 2015). V případě transportu dusíku byla také pozorována změna lokalizace některých transportérů. Například u *Arabidopsis thaliana* se AtNRT1;1 vyskytuje v mladých částech kořene v buňkách rhizodermis, zatímco ve starších částech v primární kůře a endodermis (Krouk et al., 2010).

Jedna studie koreluje změnu lokalizace transportérů vody u kukuřice (*Zea mays*) s diferenciací kořene, ve které autoři pozorovali zvýšenou přítomnost některých aquaporinů v buňkách exodermis a rhizodermis (Hachez et al., 2006b). V této studii také zaznamenali zvýšenou expresi některých aquaporinů v elongační a maturační zóně oproti kořenové špičce. Nejvýraznější nárůst exprese ve starších částech kořene byl pozorován u transportéru lokalizovaného právě v exodermis, endodermis a distální straně buněk rhizodermis, z čehož vyplývá možná změna lokalizace transportérů s diferenciací kořene a apoplastických bariér a usnadnění transportu vody v těchto diferencovaných částech kořene.

Ověření pozorované redistribuce fosfátových transportérů v rámci této práce proběhlo pomocí konfokálního mikroskopu, avšak dle výsledků snímání konfokálním mikroskopem byla pozorována do jisté míry přítomnost transportérů fosfátu u ječmene (*Hordeum vulgare*) v rhizodermis i primární kůře v diferencovaných částech kořene. Tato skutečnost by mohla představovat zapojení buněk primární kůry v transcelulárním transportu, jako je tomu například v případě transportu křemíku a výskytu jeho transportérů (Lsi1) v primární kůře. Stejně tak je tomu v případě transportu křemíku u kukuřice (*Zea mays*), zatímco u rýže (*Oryza sativa*) je tento transportér lokalizován v apoplastických bariérách (Mitani et al., 2009).

5.3. Vliv suberinové lamely

Druhou otázkou řešenou v rámci této diplomové práce bylo, zda uložení suberinové lamely koreluje s vymizením membránových transportérů, které se účastní příjmu živin a jejich radiálního transportu, neboť přítomnost SL ovlivňuje přístupnost látek k plazmatické membráně buněk apoplastických bariér. Co se týče suberinových lamel a jejich vlivu na lokalizaci membránových transportérů, není nám známa žádná studie, která by se zabývala touto konkrétní otázkou, přestože se již mnoho autorů zabývalo vlivem suberinu na prostupnost buněk. Již autor Haberlandt (1884) předpokládal větší propustnost krátkých buněk dimorfní exodermis, kde k ukládání suberinových lamel nedochází nebo je opožděno. V pozdějších pracích jsou tyto buňky nazývány jako tzv. propustné buňky, které usnadňují transport látek v místě apoplastických bariér (Meyer et al., 2011a; Peterson a Enstone, 1996). Vyšší propustnost propustných buněk byla experimentálně zkoumána a dokázána pomocí sond (tracerů) (PTS, Fe^{2+} ,...) (Pecková et al., 2016). Byla také pozorována přístupnost a propustnost membrány endodermis pomocí FDA (fluorescein diacetát), kdy se tato látka stane fluorescentní po příjmu do živé buňky (Barberon et al., 2016). U suberinizovaných buněk byl světelný signál pozorován s několika minutovým zpožděním oproti buňkám bez suberinových lamel. Z toho vyplývá zpomalení vstupu látek z apoplastu do cytosolu buněk, avšak nikoliv úplná izolace, neboť plazmodermy zůstávají průchodné (Barberon et al., 2016b). Bylo by tedy zajímavé sledovat vliv uložení suberinové lamely na přítomnost membránových transportérů na úrovni konkrétní buňky.

Na otázku, zda uložení suberinové lamely ovlivňuje lokalizaci membránových transportérů, se nám imunodetekcí fosfátových transportérů ječmene bohužel nepodařilo odpovědět, neboť jejich lokalizace byla pozorována pouze v mladých částech kořene, kde ještě nebyly vytvořeny exodermální SL ani CP. Dalším možným způsobem, jak na tuto otázku odpovědět, bylo připravit rýži nesoucí translační fúzi křemíkového transportérů *Lsi1* s GFP. Tento transportér byl totiž lokalizován na plazmatických membránách buněk apoplastických bariér (Ma et al., 2006). V případě tohoto experimentu byla získána pouze kódující sekvence genu *Lsi1* z genomické DNA i cDNA. I přes značné úsilí a vyzkoušení několika různých primerů pro sekvenci promotoru, se nám nepodařilo promotor amplifikovat. V případě některých primerů vyšla pozitivně kontrolní restrikce, avšak následná sekvenace ukázala, že se do vektoru zaklonovalo něco jiného, co délkou sekvence odpovídalo našemu promotoru. V rámci toho experimentu byla nicméně optimalizována příprava kalusu a regenerace celistvé rostliny.

6. Závěr

Tato diplomová práce měla za cíl analyzovat vliv deficiencie fosfátu na diferenciaci apoplastické bariéry exodermis a jak tato vrstva ovlivňuje lokalizaci membránových transportérů. Z experimentů s ječmeny (*Hordeum vulgare*) vyplývá, že deficiencie fosfátu indukuje tvorbu exodermis blíže ke špičce. Vliv této bariéry na lokalizaci transportérů podél podélné osy kořene s její postupující diferenciací byl zkoumán taktéž na ječmeni. Byla sledována lokalizace vysokafinitních fosfátových transportérů. V tomto případě nebyl cíl zcela dosažen, neboť příjem fosfátu probíhá zřejmě převážně kořenovou špičkou, kde k detekovatelné diferenciaci exodermis nedochází. Přesto byla fluorescenčním mikroskopem pozorována redistribuce těchto transportérů a jejich vymizení z primární kůry v oblastech blízkých kořenové špičce (1/4 délky kořene). Nebyl tedy pozorován ani vliv suberinové lamely na lokalizaci membránových transportérů, neboť nebylo možné korelovat její výskyt s výskytem fosfátových transportérů, které mizí dříve, než se SL začnou tvořit a další část této práce – transformace rýže (*Oryza sativa*) nebyla z časových důvodů dokončena. Podařilo se alespoň optimalizovat metodiku regenerace rostlin z rýžových kalusů a amplifikovat kódující sekvenci genu *OsLsi1*.

7. Použitá literatura

- Alassimone, J., Naseer, S., Geldner, N., 2010. A developmental framework for endodermal differentiation a polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 5214–5219.
- Armstrong, J., Armstrong, W., 2005. Rice: Sulfide-induced Barriers to Root Radial Oxygen Loss, Fe²⁺ a Water Uptake, a Lateral Root Emergence. *Ann Bot* 96, 625–638.
- Barberon, M., 2017. The endodermis as a checkpoint for nutrients. *New Phytologist* 213, 1604–1610.
- Barberon, M., Dubeaux, G., Kolb, C., Isono, E., Zelazny, E., Vert, G., 2014. Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *PNAS* 111, 8293–8298.
- Barberon, M., Geldner, N., 2014. Radial Transport of Nutrients: The Plant Root as a Polarized Epithelium. *PLANT PHYSIOLOGY* 166, 528–537.
- Barberon, M., Vermeer, J.E.M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Aersen, T.G., Humbel, B.M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D.E., Geldner, N., 2016a. Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* 164, 447–459.
- Barberon, M., Vermeer, J.E.M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Aersen, T.G., Humbel, B.M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D.E., Geldner, N., 2016b. Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* 164, 447–459.
- Bernards, M.A., 2002. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80, 227–240.
- Bernstein, L., Nieman, R.H., 1960. Apparent free space of plant roots. *Plant physiology* 35, 589.
- Boher, P., 2013. The potato suberin feruloyl transferase FHT which accumulates in the phellogen is induced by wounding and regulated by abscisic and salicylic acids. *Journal of Experimental Botany* 64, 3225–3236.
- Bonnett, H., T., 1968. The root endodermis: fine structure a function. Department of Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403.
- Brady, N. C., Weil, R. R., 2001. *The Nature and Properties of Soils*. Uper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall.
- Brundrett, M., Murase, G., Kendrick, B., 1990. Comparative anatomy of roots a mycorrhizae of common Ontario trees. *Canadian Journal of Botany* 68, 551–578.
- Ceulemans, T., Merckx, R., Hens, M., Honnay, O., 2013. Plant species loss from European semi-natural grasslands following nutrient enrichment - is it nitrogen or is it phosphorus? Does N or P drive species loss? *Global Ecology and Biogeography* 22, 73–82.
- Cheng, H., Tam, N.F.-Y., Wang, Y., Li, S., Chen, G., Ye, Z., 2012. Effects of copper on growth, radial oxygen loss a root permeability of seedlings of the mangroves *Bruguiera gymnorrhiza* a *Rhizophora stylosa*. *Plant a Soil* 359, 255–266.
- Cholewa, E., Peterson, C.A., 2004. Evidence for Symplastic Involvement in the Radial Movement of Calcium in Onion Roots. *Plant Physiology* 134, 1793–1802.
- Chu, 1975. ESTABLISHMENT OF AN EFFICIENT MEDIUM FOR ANTHOR CULTURE OF RICE THROUGH COMPARATIVE EXPERIMENTS ON THE NITROGEN SOURCES. *Scientia Sinica* 18, 659–668.
- Clarkson, D.T., Robards, A.W., Saerson, J., 1971. The tertiary endodermis in barley roots: Fine structure in relation to radial transport of ions a water. *Planta* 96, 292–305.

- Clarkson, D.T., Carvajal, M., Henzler, T., Waterhouse, R., Smyth, A.J., Cooke, D.T., Steudle, E., 2000. Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *Journal of Experimental Botany* 51, 61–70.
- Cottle, W. Kolattukudy, P. E., 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.
- Cruz, R.T., Jordan, W.R., Drew, M.C., 1992. Structural Changes a Associated Reduction of Hydraulic Conductance in Roots of *Sorghum bicolor* L. following Exposure to Water Deficit. *PLANT PHYSIOLOGY* 99, 203–212.
- Dainty, J., Hope, A.B., 1961. The electric double layer a the Donnan equilibrium in relation to plant cell walls. *Australian journal of biological sciences* 14, 541–551.
- Damus, M., Peterson, R.L., Enstone, D.E., Peterson, C.A., 1997. Modifications of cortical cell walls in roots of seedless vascular plants. *Botanica Acta* 110, 190–195.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., 1998. Effects of exposure to humid air on epidermal viability a suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant, Cell & Environment* 21, 837–844.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., Ma, F., 2003. Root Endodermis a Exodermis: Structure, Function, a Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 335–351.
- Esau, K., 1953. *Plant Anatomy*. Wiley, New York.
- Forde, B.G., 2000. Nitrate transporters in plants structure function a regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 219-235.
- Gahoonia, T.S., Nielsen, N.E., 1998. Variation in root hairs of barley cultivars doubled soil phosphorus uptake. *Euphytica* 98, 177-182.
- Gahoonia, T. S., Nielsen, N.E., 1997. Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus (³²P) uptake from soil. *Plant a soil* 198, 147-152.
- Geldner, N., 2013. The Endodermis. *Annual Review of Plant Biology* 64, 531–558.
- Gilroy, S., Jones, D.L., 2000. Through form to function: root hair development a nutrient uptake. *Trends in plant science* 5, 56-60.
- Gordon-Weeks, R., 2003. Restricted spatial expression of a high-affinity phosphate transporter in potato roots. *Journal of Cell Science* 116, 3135–3144.
- Haberlandt, G., 1884. *Physiologische Pflanzenanatomie*.
- Hachez, C., Moshelion, M., Zelazny, E., Cavez, D., Chaumont, F., 2006a. Localization a Quantification of Plasma Membrane Aquaporin Expression in Maize Primary Root: A Clue to Understaing their Role as Cellular Plumbers. *Plant Molecular Biology* 62, 305–323.
- Hachez, C., Moshelion, M., Zelazny, E., Cavez, D., Chaumont, F., 2006b. Localization a Quantification of Plasma Membrane Aquaporin Expression in Maize Primary Root: A Clue to Understaing their Role as Cellular Plumbers. *Plant Molecular Biology* 62, 305–323.
- Hoagland, D., Arnon, D., 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347, 2nd edit pp.32 pp.
- Hose, E., Clarkson, D.T., Steudle, E., Schreiber, L., Hartung, W., 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. *J. Exp. Bot.* 52, 2245–2264.
- Huang, N.C., Chiang, C.S., Crawford, N.M., Tsay, Y.F., 1996. CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* a shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* 8, 2183–2191.
- Itoh, S., Barber, S.A., 1983. Phosphorus Uptake by Six Plant Species as Related to Root Hairs 1. *Agronomy Journal* 75, 457–461.

- Joca, T.A.C., Oliveira, D.C. de, Zotz, G., Winkler, U., Moreira, A.S.F.P., 2017. The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure a correlations with nutrient absorption. *Flora* 230, 66–74.
- Jungk, A., 2001. Root hairs a the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition a Soil Science* 164, 121–129.
- Kamula, S.A., Peterson, C.A., Mayfield, C.I., 1994. The plasmalemma surface area exposed to the soil solution is markedly reduced by maturation of the exodermis a death of the epidermis in onion roots. *Plant, Cell a Environment* 17, 1183–1193.
- Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H.S., Schreiber, L., Mathew, M.K., 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., Mathew, M.K., 2011. Root apoplastic barriers block Na⁺ transport to shoots in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 62, 4215–4228.
- Kroemer, K., 1903. Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermentwurzel. *Bibliotheca Botanica* 1–160.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., Gojon, A., 2010. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* 18, 927–937.
- Lambers, H., Ahmedi, I., Berkowitz, O., Dunne, C., Finnegan, P. M., 2013. Phosphorus nutrition of phosphorus-sensitive Australian native plants: threats to plant communities in a global biodiversity hotspot. *Conservation Physiology* 1.
- Laštůvka, Z., Minář, J., 1967. Metoda vodních kultur vyšších rostlin. Univerzita J.E. Purkyně.
- Lauter, F.R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J.W., Frommer, W.B., 1996. Preferential expression of an ammonium transporter a of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8139–8144.
- Lee, Y., Rubio, M.C., Alassimone, J., Geldner, N., 2013. A Mechanism for Localized Lignin Deposition in the Endodermis. *Cell* 153, 402–412.
- Levy, A., Guenoune-Gelbart, D., Epel, B.L., 2007. beta-1,3-Glucanases: Plasmodesmal Gate Keepers for Intercellular Communication. *Plant Signal Behav* 2, 404–407.
- Liu, K., Liu, L.-L., Ren, Y.-L., Wang, Z.-Q., Zhou, K.-N., Liu, X., Wang, D., Zheng, M., Cheng, Z.-J., Lin, Q.-B., Wang, J.-L., Wu, F.-Q., Zhang, X., Guo, X.-P., Wang, C.-M., Zhai, H.-Q., Jiang, L., Wan, J.-M., 2015. Dwarf a tiller-enhancing 1 regulates growth a development by influencing boron uptake in boron limited conditions in rice. *Plant Science* 236, 18–28.
- Lucas, W.J., Ding, B., Schoot, C., 1993. Plasmodesmata a the supracellular nature of plants. *New Phytologist* 125, 435–476.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., White, P.J., 2011. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot* 62, 21–37.
- Lux, A., Šottníková, A., Opatrna, J., Greger, M., 2004. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation a sensitivity. *Physiologia Plantarum* 120, 537–545.
- Ma, F., 2000. Plasmodesmata a symplastic transport in onion (*Allium cepa* L.) roots.
- Ma, F., Peterson, C.A., 2000. Plasmodesmata in onion (*Allium cepa* L.) roots: a study enabled by improved fixation a embedding techniques. *Protoplasma* 211, 103–115.
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M., 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440, 688–691.
- Ma, J.F., Yamaji, N., 2015. A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends in Plant Science* 20, 435–442.

- Ma, J.F., Yamaji, N., Tamai, K., Mitani, N., 2007. Genotypic Difference in Silicon Uptake a Expression of Silicon Transporter Genes in Rice. *Plant Physiol.* 145, 919–924.
- Main, M., Frame, B., Wang, K., 2015. Rice, Japonica (*Oryza sativa* L.), *Agrobacterium* Protocols. Springer New York, New York, NY, pp. 169–180.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Gulf Professional Publishing.
- Meyer, C.J., Peterson, C.A., Bernards, M.A., 2011a. Spatial a temporal deposition of suberin during maturation of the onion root exodermis. *Botany* 89, 119–131.
- Meyer, C.J., Peterson, C.A., Steudle, E., 2011b. Permeability of *Iris germanica*'s multiseriate exodermis to water, NaCl, a ethanol. *J. Exp. Bot.* 62, 1911–1926.
- Meyer, C.J., Seago, J.L., Peterson, C.A., 2009. Environmental effects on the maturation of the endodermis a multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Ann Bot* 103, 687–702.
- Micheli, F., 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6, 414–419.
- Mitani, N., Yamaji, N., Ma, J.F., 2009. Identification of Maize Silicon Influx Transporters. *Plant Cell Physiol* 50, 5–12.
- Mudge, S.R., Rae, A.L., Diatloff, E., Smith, F.W., 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *The Plant Journal* 31, 341–353.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C., Geldner, N., 2012. Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 10101–10106.
- Neuhäuser, B., Dynowski, M., Mayer, M., Ludewig, U., 2007. Regulation of NH₄⁺ Transport by Essential Cross Talk between AMT Monomers through the Carboxyl Tails. *Plant Physiol.* 143, 1651–1659.
- Nussaume, L., 2011. Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Frontiers in Plant Science* 2.
- Palevitz, B.A., Hepler, P.K., 1985. Changes in dye coupling of stomatal cells of *Allium* a *Commelina* demonstrated by microinjection of Lucifer yellow. *Planta* 164, 473–479.
- Pecková, E., Tylová, E., Soukup, A., 2016. Tracing root permeability: comparison of tracer methods. *Biol Plant* 60, 695–705.
- Perumalla, C.J., Peterson, C.A., Enstone, D.E., 1990. A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bas. I. Roots with a uniseriate hypodermis a epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103, 93–112.
- Peterson, C.A., Enstone, D.E., 1996. Functions of passage cells in the endodermis a exodermis of roots. *Physiologia Plantarum* 97, 592–598.
- Peterson, C.A., Martina Murrmann, Ernst Steudle, 1993. Location of the major barriers to water a ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta* 190, 127–136.
- Pfister, A., Barberon, M., Alassimone, J., Kalmbach, L., Lee, Y., Vermeer, J.E., Yamazaki, M., Li, G., Maurel, C., Takano, J., Kamiya, T., Salt, D.E., Roppolo, D., Geldner, N., 2014. A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *eLife* 3.
- Pozuelo, J.M., Espelie, K.E., Kolattukudy, P.E., 1984. Magnesium Deficiency Results in Increased Suberization in Endodermis a Hypodermis of Corn Roots. *Plant Physiol.* 74, 256–260.
- Radin, J. W., Matthews, M. A., 1989. Water Transport Properties of Cortical Cells in Roots of Nitrogen- and Phosphorus-Deficient Cotton Seedlings, *PLANT PHYSIOLOGY* 89, 264–268.
- Ranathunge, K., Steudle, E., Lafitte, R., 2005. Blockage of apoplastic bypass-flow of water in rice roots by insoluble salt precipitates analogous to a Pfeffer cell. *Plant, Cell & Environment* 28, 121–133.

- Ranathunge, K., Steudle, E., Lafitte, R., 2003. Control of water uptake by rice (*Oryza sativa* L.): role of the outer part of the root. *Planta* 217, 193–205.
- Redjala, T., Zelko, I., Sterckeman, T., Legué, V., Lux, A., 2011. Relationship between root structure a root cadmium uptake in maize. *Environmental a Experimental Botany* 71, 241–248.
- Reinhardt, D.T., Rost, T.L., 1995. SALINITY ACCELERATES ENDODERMAL DEVELOPMENT A INDUCES AN EXODERMIS IN COTTON SEEDLING ROOTS. *Environmental a experimental Botany* 35, 563-574.
- Roppolo, D., Boeckmann, B., Pfister, A., Boutet, E., Rubio, M.C., Dénervaud-Tendon, V., Vermeer, J.E.M., Gheyselinck, J., Xenarios, I., Geldner, N., 2014. Functional a Evolutionary Analysis of the CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN Family. *Plant Physiol.* 165, 1709–1722.
- Roppolo, D., De Rybel, B., Tendon, V.D., Pfister, A., Alassimone, J., Vermeer, J.E.M., Yamazaki, M., Stierhof, Y.-D., Beeckman, T., Geldner, N., 2011. A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* 473, 380–383.
- Rose, J.K.C. (Ed.), 2003. *The plant cell wall*, Annual plant reviews. Blackwell [u.a.], Oxford.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Ma, J.F., 2016. Transporters involved in mineral nutrient uptake in rice. *J. Exp. Bot.* erw060.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., Ma, J.F., 2012. Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese a Cadmium Uptake in Rice. *The Plant Cell* 24, 2155–2167.
- Sattelmacher, B., 2000. The apoplast a its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 149, 167–192.
- Schjørring, J., Nielsen, N.E., 1987. Root length a phosphorus uptake by four barley cultivars grown under moderate deficiency of phosphorus in field experiments. *Journal of Plant Nutrition* 10, 1289–1295.
- Schraut, D., 2005. Radial transport of water a 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., 2004. Effects of NO₃ deficiency a NaCl stress on suberin deposition in rhizoa hypodermal (RHCW) a endodermal cell walls (ECW) of castor bean (*Ricinus communis* L.) roots. *Plant a soil* 269, 333-339.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., Zeier, J., 1999. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal a hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* 50, 1267–1280.
- Schunmann, P.H.D., 2004. Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 55, 855–865.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, a terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100, 179–196.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., Wirén, N. von, Yamaya, T., Yamaguchi, J., 2003. Distinct Expression a Function of Three Ammonium Transporter Genes (OsAMT1;1 – 1;3) in Rice. *Plant Cell Physiol* 44, 726–734.
- Soukup, A., 2014. Selected Simple Methods of Plant Cell Wall Histochemistry a Staining for Light Microscopy, in: Žárský, V., Cvrčková, F. (Eds.), *Plant Cell Morphogenesis*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 25–40.
- Soukup, A., Armstrong, W., Schreiber, L., Franke, R., Votrubová, O., 2007. Apoplastic barriers to radial oxygen loss a solute penetration: a chemical a functional comparison of the exodermis of two wetla species, *Phragmites australis* a *Glyceria maxima*. *New Phytologist* 173, 264–278.

- Soukup, A., Votrubová, O., Čížková, H., 2002. Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* 153, 277–287.
- Stasovski, E., Peterson, C., 1993. Effects of drought a subsequent rehydration on the structure, vitality, a permeability of *Allium cepa* adventitious roots. *Canadian Journal of Botany* 71, 700–707.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2014. *Plant Physiology a Development*. Sinauer Associates Inc., U.S., Sunderland, United States.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T., 2010. Polar localization a degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 5220–5225.
- Taleisnik, E., 1999. Water Retention Capacity in Root Segments Differing in the Degree of Exodermis Development. *Annals of Botany* 83, 19–27.
- Tena, G., 2017. Development: Casparian self-healing. *Nature Plants* 3, 17021.
- Tyč, D., 2011. Umlčování exprese transgenů v rostlinách bramboru a v buněčné linii tabáku BY-2. 97.
- Vaculík, M., Konlechner, C., Langer, I., Adlassnig, W., Puschenreiter, M., Lux, A., Hauser, M.-T., 2012. Root anatomy a element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. *Environmental Pollution* 163, 117–126.
- Vašková, K., 2007. Symplastické propojení buněk v průběhu diferenciacie primární kůry kořene.
- Velasquez, S.M., Kleine-Vehn, J., 2016. Cell biology: Zipping the Casparian strip. *Nature Plants* 2, 16118.
- Yamaji, N., Ma, J.F., 2007. Spatial Distribution a Temporal Variation of the Rice Silicon Transporter *Lsi1*. *Plant Physiol.* 143, 1306–1313.
- Zeier, J., Goll, A., Yokoyama, M., Karahara, I., Schreiber, L., 1999. Structure a chemical composition of endodermal a rhizodermal/hypodermal walls of several species. *Plant, Cell & Environment* 22, 271–279.
- Zimmermann, H.M., Hartmann, K., Schreiber, L., 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, H.M., Steudle, E., 1998. Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206, 7–19.