

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Anatomie a fyziologie rostlin



dizertační práce

**Vývoj postranních kořenů a apoplastických bariér v kořenovém systému kukuřice (*Zea mays* L.)**

**The development of lateral roots and apoplastic barriers in maize (*Zea mays* L.) root system**

**Eva Pecková**

Vedoucí dizertační práce:

**RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.**

**Praha 2014**

## **Finanční zajištění práce:**

Práce byla vypracována za finanční podpory GAUK 251346, COST LD 11017 a MSM 0021620858.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem předkládanou dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením Dr. Aleše Soukupa. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena na žádné jiné vysoké škole a uvedená data nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Všechny použité literární zdroje byly řádně citovány. V práci je jasně vymezen můj osobní podíl na řešených projektech a spoluautoři publikací souhlasí s jejich začleněním do dizertační práce.

V Praze, dne 9.9.2014

Eva Pecková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych zejména poděkovat svému školiteli RNDr. Aleši Soukupovi, Ph.D. za podnětné připomínky, rady a doporučení, bez nichž by tato práce nevznikla.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za pomoc, ochotu a vytvoření přátelského prostředí a RNDr. Olze Votrubové, CSc. za schopnost povzbudit v každé situaci.

Mé díky patří i všem ostatním kolegům naší laboratoře a i všem ostatním členům z Katedry experimentální biologie rostlin v Praze za zajištění velmi příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji mé rodině a přátelům, kteří mě nesmírně podporovali při studiu a zejména pak při dokončování této práce.

Děkuji svému manželovi za jeho porozumění, psychickou podporu a neobyčejnou trpělivost a miminku, že počkalo na dopsání této práce.

## **SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

<i>lrt1</i>	<i>lateral rootless 1</i> , mutant kukuřice ( <i>Zea mays</i> L.)
SEM	skenovací (též rastrovací či řádkovací) elektronový mikroskop
TEM	transmisní elektronový mikroskop
PTS	trisodium 3-hydroxy-5,8,10-pyrenetrisulfonát, apoplastická sonda

### **V publikovaném článku/manuskriptech:**

LR	lateral roots
LRP	primordium of lateral root
PR	primary root
LR-L	long branched lateral roots
LR-M	middle-length branched lateral roots
LR-S	short unbranched lateral roots
AER	aerated hydroponics
STAG	stagnant hydroponics with 0.05% agar
STAG+AO	stagnant hydroponics with 0.05% agar + 2mM organic acids
AER+SALT	aerated hydroponics + 100mM NaCl
AER+5Cd	aerated hydroponics + 5 $\mu$ M Cd <sup>2+</sup>
AER+50Cd	aerated hydroponics + 50 $\mu$ M Cd <sup>2+</sup>
SOIL	soil moistened with tap water
FLO	soil flooded with tap water
PER	mixture of fine quartz sand and perlite (1:1) with tap water
UV	ultraviolet radiation
PHAR	photosynthetically active radiation

**OBSAH**

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>5</b>
1.1 Úvod do problematiky .....	5
1.1.1 Vznik a vývoj postranních kořenů .....	5
1.1.2 Studium mutantních rostlin .....	7
1.1.3 Kukuřičný mutant <i>lrt1</i> ( <i>lateral rootless 1</i> ).....	8
1.1.4 Apoplastické bariéry .....	9
1.1.5 Vliv podmínek prostředí na vývoj apoplastických bariér .....	12
1.1.6 Apoplastické bariéry se vytvářejí nejen v hlavních kořenech.....	13
1.1.7 Testování propustnosti apoplastu .....	14
1.2 Cíle práce .....	16
<b>2. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>18</b>
2.1 Rostlinný materiál.....	18
2.2 Typy kultivací a kultivační podmínky .....	18
2.3 Zpracování materiálu .....	19
2.3.1 Ruční řezy.....	19
2.3.2 Trvalé preparáty.....	19
2.3.3 Příprava vzorků na TEM .....	19
2.3.4 Příprava vzorků na SEM .....	20
2.3.5 Projasnění kořenů .....	20
2.3.6 Aktivita peroxidázy .....	20
2.3.7 Test propustnosti a hodnocení .....	20
2.3.8 Analýza jednotlivých vývojových stádií a kvantifikace primordií/postranních kořenů.....	20
2.3.9 Kvantifikace ligninu.....	21
2.3.10 Hodnocení distribuce Casparyho proužků a suberinových lamel .....	21
2.3.11 Obrazová analýza .....	21
2.3.12 Mikroskopie .....	21
2.3.13 Statistické analýzy.....	22
<b>3. SOUHRN VÝSLEDKŮ PRÁCE.....</b>	<b>23</b>
3.1 Analýza kořenového systému mutantu <i>lrt1</i> kukuřice ( <i>Zea mays</i> ).....	23
3.1.1 Podíl práce.....	24
3.1.2 Publikace .....	24
3.2 Studium variability struktury a funkce apoplastických bariér v rámci celého kořenového systému kukuřice ( <i>Zea mays</i> ) za různých podmínek prostředí .....	41
3.2.1 Podíl práce.....	42
3.2.2 Publikace .....	42
3.3 Testy propustnosti.....	85
3.3.1 Podíl práce.....	86
3.3.2 Publikace .....	86

---

<b>4. DISKUZE</b> .....	<b>119</b>
4.1 Vliv mutace genu LRT1 na vývoj postranních kořenů kukuřice ( <i>Zea mays</i> ) .....	119
4.2 Detekované změny v hlavních kořenech <i>lrt1</i> .....	121
4.3 Vývoj apoplastických bariér v rámci kořenového systému kukuřice ( <i>Zea mays</i> ) za různých podmínek prostředí .....	123
4.4 Rozdíly ve vývoji endodermis mezi hlavním a postranními kořeny; vliv podmínek prostředí.....	123
4.5 Srovnání vývoje exodermis a její propustnosti v rámci kořenového systému; vliv kultivačních podmínek.....	125
4.6 Problémy s detekcí exodermálních Casparyho proužků v hypoxické kultivaci .....	127
4.7 Testy propustnosti.....	128
4.8 Propustnost exodermální bariéry .....	129
4.9 Porovnání pohybu jednotlivých apoplastických sond v primární kůře.....	130
4.10 Chování apoplastických sond ve špičkách hlavních kořenů.....	131
4.11 Chování apoplastických sond v postranních kořenech .....	132
<b>5. ZÁVĚRY</b> .....	<b>134</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>135</b>
<b>6. SEZNAM LITERATURY</b> .....	<b>137</b>

## **ABSTRAKT**

Tvorba kořenového systému rostlin je důležitým ekofyziologickým a agronomickým parametrem, a také aktuálním tématem vývojové biologie rostlin. Jeho velmi důležitou součástí jsou postranní kořeny, které tvoří většinou hlavní část absorpčního povrchu rostliny v rhizosféře. Jedním z mála popsaných mutantů (vyjma modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*) s poruchou vývoje postranních kořenů je kukuřičný (*Zea mays*) *lrt1* (*lateral rootless 1*), u něhož byla popsána chyba v iniciaci postranních kořenů v časném postembryonálním vývoji. Naše detailní anatomicko-morfologická studie mutantu poskytuje nový pohled na funkci genu LRT1. Zjistili jsme, že iniciace primordií u *lrt1* je silně závislá na podmínkách prostředí a struktura primordií, včetně jejich emergence a pozdějšího vývoje je silně narušená. Naopak hlavní kořeny nevykazují tak silné ovlivnění touto mutací, ačkoliv určité narušení bylo nalezeno v povrchových vrstvách kořenů. Ty byly spojeny s indukovanou lignifikací, zvýšenou aktivitou peroxidázy a se změnami v pronikání látek povrchem kořene.

Změny v propustnosti povrchových vrstev nás zavedly k problematice apoplastických bariér, která však byla řešena na tradičním a vyzkoušeném genotypu kukuřice (*Z. mays*) cv. Cefran. Naše práce poskytuje unikátní pohled na tvorbu těchto bariér v rámci celého kořenového systému a vyplňuje značnou mezeru týkající se jejich tvorby u postranních kořenů různých řádů. Navíc na jednom místě shrnuje vliv osmi nejčastěji se vyskytujících/experimentálně využívaných kultivačních podmínek. Ty působily výrazné změny při utváření endodermis i exodermis. Nejvýraznější rozdíly v rámci kořenového systému jsme pozorovali mezi krátkými postranními kořeny. Chování dlouhých větvených postranních kořenů se nejvíce přibližuje popsaným charakteristikám hlavních kořenů.

V průběhu dizertační práce byla použita technika testů propustnosti povrchu kořenů. Při jejím užívání jsme zjistili velkou variabilitu ve výsledcích dle typu použité sondy. Ačkoliv je tato metodika často využívána, dosud neexistuje srovnání zabývající se určitou variabilitou mezi výsledky jednotlivých přístupů. Proto byli vybráni zástupci nejčastěji využívaných „apoplastických sond“ a sledováno jejich chování současně ve dvou různých rostlinných druzích s odlišně propustnými povrchovými vrstvami. Dosažené výsledky byly porovnány a diskutovány s výstupy ostatních prací. Výsledky ukazují na výrazný vliv rostlinného druhu, použité koncentrace, délce aplikace a individuálních vlastností použitých sond. Diskutována byla vhodnost jejich využití a omezení z pohledu apoplastického transportu.

## **ABSTRACT**

The formation of plant root system is an important ecophysiological and agronomical parameter and also an actual topic of developmental plant biology. Lateral roots are its very important part which creates majority of the main absorbent portion of the plant surface in the rhizosphere. One of the few described mutants (except the model plant *Arabidopsis thaliana*) with impaired development of lateral roots in early postembryonic development is maize (*Zea mays*) mutant *lrt1* (*lateral rootless 1*). Our detailed anatomical-morphological study of *lrt1* provides new insight into LRT1 gene function. We found out that initiation of *lrt1* primordia takes place and is strongly dependent on environmental conditions. The structure of primordia, also their emergence and later development is strongly affected. On the contrary, the main roots do not show so strong influence by this mutation, although some disruptions were found in surface root layers. These disturbances were connected with induced lignification, increased activity of peroxidase and with changes in permeation of root surface.

Changes in permeability of surface layers led us to the issue of apoplastic barriers, what was dealt to the traditional and previously tested another genotype of maize (*Z. mays*). Our work provides a unique insight into the creation of these barriers not only in the context of the whole root system but fills in a most important gap about lateral roots of different orders. Moreover, it summarizes the influence of eight most frequently studied conditions. These conditions caused significant changes in the formation of endodermis and exodermis. The largest differences were observed between short lateral roots. The behavior of long branched lateral roots was very similar to the described characteristics of main roots.

The technique of permeability tests was used during these studies. However, we found out high variability in the results according to kind of tested apoplastic probes. Although this method is often used, there is no comparative study dealing with some conflicting results of some published works yet. This is the reason why we chose the most frequently used candidates of these probes and compared their behavior on two different plant species with differently permeable surface layers. The results were compared and discussed with the outputs of other published work. Our results show the significant effect of plant species, used concentration, time of penetration and individual properties of the apoplastic probe.



# **1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE**

## **1.1 Úvod do problematiky**

Předkládaná dizertační práce se věnuje skryté části rostlin – kořenovému systému. Půda, ve které rostlina roste, je velice heterogenní systém. Její vlastnosti a vzájemná interakce s rostlinou modulují architekturu kořenového systému (Rich and Watt 2013), jehož podstatnou součástí jsou postranní kořeny. Ty nesou největší podíl na příjmu vody a živin ze substrátu a tvoří obvykle hlavní část absorpčního povrchu rostliny v rhizosféře. Apoplastické bariéry omezují nekontrolovatelný tok látek do rostliny. Mechanismy, které ovlivňují tvorbu postranních kořenů (Laskowski 2013; Malamy 2005) a apoplastických bariér (Enstone et al. 2003), mají zásadní vliv i na jejich přežití v určitých stresových podmínkách, jakými jsou např. období sucha nebo deficit živin a dovolují jim efektivně využívat a soutěžit o půdní zdroje.

### **1.1.1 Vznik a vývoj postranních kořenů**

Postranní kořeny vznikají obvykle postembryonálně, v tzv. diferenciační zóně rodičovského kořene, v relativně velké vzdálenosti od apikálního meristému (Dubrovsky et al. 2000; Esau 1965; Laskowski et al. 1995; Tian et al. 2014). Tato vzdálenost se liší dle rostlinného druhu, ale i rychlosti růstu, a je silně ovlivněná vnějším prostředím (Ploshchinskaya et al. 2002; Soukup et al. 2002). U semenných rostlin se zakládají endogenně v pericyklu, vrchní vrstvě středního válce. Převážně u jednoděložných rostlin, zejména pak u trav jako kukuřice (*Zea mays*) či rýže (*Oryza sativa*), vznikají přesně organizovaným dělením určitého počtu zakladatelských buněk ležících na floémových pólech (Bell and McCully 1970; Jansen et al. 2012). Následné primordium se vytváří v určité minimální vzdálenosti od posledního vytvořeného primordia blíže apexu hlavního kořene, tedy v tzv. akropetální sekvenci (Dubrovsky et al. 2006). Ačkoliv mnoho prací dokumentovalo časná stádia primordií mezi již vzniklými postranními kořeny (Dubrovsky et al. 2000; Shitan et al. 2003; Vermeer et al. 2014), práce Dubrovsky et al. (2006) jasně dokázala, že alespoň u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) zakládání primordií skutečně probíhá v akropetálním směru, avšak kdykoliv se může vývoj primordia (iniciace, ustavení meristému či emergence) zastavit či zbrzdit.

Vznik postranních kořenů je regulován vnějšími a vnitřními faktory, které spolu intereagují. Exogenní vlivy zahrnují např. dostupnost vody, přítomnost těžkých kovů, zasolení, nabídku živin, hlavně nitráty a fosfáty a mechanické působení substrátu (Casimiro et al. 2003; Krishnamurthy et al. 2009; Malamy 2005). Do endogenních vlivů lze zařadit působení fytohormonů, zejména auxinu, ale také cytokininů, ethylenu, giberelinů a ABA (Bhalerao et al. 2002; Casimiro et al. 2001; Hinchee and Rost 1986; Ivanchenko et al. 2008; Swarup et al. 2008; Tian et al. 2014; Wightman and Thimann 1980; Zimmermann et al. 2010). Přesto, že kroku definování zakladatelských buněk bylo věnováno mnoho pozornosti (Beeckman et al. 2001; De Smet 2012; Dubrovsky et al. 2000; Dubrovsky et al. 2008; Jansen et al. 2012; Lavenus et al. 2013), dosud nebylo zcela objasněno, zdali vnější faktory ovlivňují místo samotného vzniku zakladatelských buněk, nebo jsou jen schopny ovlivnit již definovaná místa, např. urychlením, nebo naopak zpomalením/zastavením vývoje založeného primordia (Van Norman et al. 2013).

Vývoj postranních kořenů byl detailně popsán u huseníčku (*A. thaliana*). Proces začíná asymetrickým antiklinálním dělením, kdy dochází k ustavení zakladatelských buněk. Následují periklinální a další organizovaná dělení, která utvářejí jednotlivé vrstvy primordia a zvětšují jeho celkový objem. Vývoj končí vynořením (tzv. emergencí) postranního kořene z rodičovských pletiv (Bialek et al. 2014; Malamy and Benfey 1997). Obecně platí tento model s určitými omezeními i u trav. Ačkoliv se dřívější práce soustředily na přesný vzorec jednotlivých dělení během vývoje primordií (Malamy and Benfey 1997; Szymanowska-Pułka and Nakielski 2010), nové práce ukazují, že pro správnou morfogenezi primordia je důležitá signalizace mezi ním a nad ním umístěnými rodičovskými pletivy, kterými v průběhu jeho vývoje prorůstá (Lucas et al. 2013; Péret et al. 2009; Roycewicz and Malamy 2014; Yue and Beeckman 2014). Dokonce již před prvním dělením vedoucím ke vzniku primordia je kritická komunikace mezi aktivovanými buňkami pericyklu a buňkami endodermis nacházejícími se nad tímto místem, jež je zprostředkovaná auxinem (Marhavý et al. 2013). Před průchodem rostoucího primordia tímto místem pak dochází k přetvoření protoplastu endodermálních buněk, které ztrácejí objem, mění tvar a dochází k částečné degradaci Casparyho proužků (Vermeer et al. 2014). Spolupráce také vede u určitých druhů k tvorbě různých dočasných struktur z mateřských přilehlých pletiv, které chrání špičku pronikajícího primordia. Tento materiál je u svlačce (*Convolvulus arvensis*) tvořen zbytky buněčných stěn buněk primární kůry, jejichž protoplasty byly selektivně degradovány (Bonnett 1969). Tyto struktury byly v minulosti nazývány odlišně, jako např. „poche digestive“ (Van Tieghem and Douliot 1888)

nebo „die Tasche“ (von Guttenberg 1968), nicméně funkce ochrany a usnadnění pronikání primordia je tatáž (Bell and McCully 1970; Charlton 1991). Koordinace mezi primordiem a pletivou rodičovského kořene zahrnuje také krok produkce auxinu vznikajícím primordiem (Benková et al. 2003), který v okolních pletivech indukuje expresi LAX 3 (LIKE AUX 1) vtokových přenašečů auxinu (Péret et al. 2009; Swarup et al. 2008). Zde auxin reguluje *IDA-HAE/ HSL2* (peptid *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* – receptor-like kináza *HAESA/ HAESA-LIKE 2*), (Kumpf et al. 2013), která indukuje enzymy, např. polygalakturonázy (Peretto et al. 1992), expanziny (Cosgrove 2000) nebo pektin lyázy (Laskowski et al. 2006), měnící mechanické vlastnosti buněčných stěn za cílem zeslabení či modifikace buněčných stěn a rozvolnění buněk podél střední lamely a tím usnadnění průniku primordia (Roycewicz and Malamy 2014; Swarup et al. 2008).

Během pronikání rodičovskými pletivou dochází k porušení integrity pletiv ležících vně od pericyklu, čímž vzniká možnost nekontrolovatelného vstupu látek, včetně patogenů do rostliny. Pro obnovení bariér ohraničujících vnitřní prostor rostliny a kontinua povrchu rostlinného orgánu dochází k suberinizaci, lignifikaci (u obilnin či rákosu, *Phragmites australis*) nebo k akumulaci fenolů (u jestřábníku, *Hieracium florentinum*), (Charlton 1991; Peterson 1979; Soukup et al. 2002). U kukuřice (*Z. mays*) bylo také během emergence a bezprostředně poté zjištěno uvolňování benzoxazinoidů, obranných molekul, které jsou toxické pro hmyz, houby i bakterie (Park et al. 2004). Vývoj postranního kořene končí diferenciací vodivých pletiv a jejich následným napojením na vodivá pletiva rodičovského kořene (Esau 1965).

### 1.1.2 Studium mutantních rostlin

Jedním z důležitých nástrojů funkční genomiky pro objasnění mechanismů iniciace, tvorby a růstu postranních kořenů je využívání mutantních rostlin. Množství těchto mutantů mimo modelovou rostlinu huseníček (*Arabidopsis thaliana*) je však stále poměrně omezené. Vzhledem k tomu, že kukuřice (*Zea mays*), popř. rýže (*Oryza sativa*) patří mezi jednoděložné rostliny s heterogenní strukturou kořenového systému a variabilitou ve vytváření postranních kořenů na primárních a adventivních kořenech, oproti huseníčku (*A. thaliana*), (Hochholdinger et al. 2004b; Smith and De Smet 2012), lze předpokládat, že mechanismy regulace se mohou mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami výrazně lišit. Je tedy velmi přínosné studovat vývoj kořenů u zástupců jednoděložných rostlin, i přes vyšší metodickou a časovou náročnost.

U rýže (*O. sativa*) byly popsány jednak mutantní genotypy nevytvářející vůbec postranní kořeny výsledkem změn v auxinové signalizaci - *Lrt1* (*Lateral rootless 1*), (Chhun et al. 2003a), *lrt2* (*lateral rootless 2*), (Wang et al. 2006) a *rm109* (*rice mutant 109*), (Hao and Ichii 1999) nebo vytvářející postranní kořeny v redukovaném množství - *cr11* (*crown rootless 1*) (Inukai et al. 2005), *arm1* (*auxin-resistant mutant 1*) a *arm2* (*auxin-resistant mutant 2*), (Chhun et al. 2003b). U kukuřice (*Z. mays*) zatím byly popsány jen čtyři mutantní genotypy s poruchami v utváření postranních kořenů: mutanti *slr1* (*short lateral roots 1*), *slr2* (*short lateral roots 2*) ukazující defekt v růstu postranních kořenů (Hochholdinger et al. 2001), *rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*) netvořící hlavní a postranní kořeny (Woll et al. 2005) a pro tuto práci zvolený mutant *lrt1* (*lateral rootless 1*), (Hochholdinger and Feix 1998).

### 1.1.3 Kukuřičný mutant *lrt1* (*lateral rootless 1*)

Monogenní recesivní mutant *lrt1* vznikl náhodnou indukci bodových mutací pomocí EMS (mutagen ethylmethan sulfonát) u B73 linie kukuřice (*Zea mays*), která byla použita i pro přečtení kukuřičného genomu (Schnable 2009). Leží na krátkém rameni druhého chromozomu, avšak mapování a přesná identifikace tohoto genu stále probíhá. Dle původní studie se tento mutant zdál velmi významným nástrojem pro studium iniciace postranních kořenů vzhledem k popsanému defektu v zakládání postranních kořenů na primárním a seminálních adventivních kořenech v časném postembryonálním vývoji (Hochholdinger and Feix 1998). V tomto smyslu byl používán jako experimentální model - kontrola bez iniciace primordií i v následných pracích (Hochholdinger et al. 2004a; Hochholdinger et al. 2001; Park et al. 2004). Přesto však dosud chyběla detailní anatomická studie upřesňující fenotypový projev mutace.

Množství informací o mutantu *lrt1* chování bylo na počátku naší práce velmi omezené. Částečná obnova tvorby postranních kořenů se podařila při působení arbuskulární mykorhizy s houbou *Glomus moseae* nebo při zvýšení dodávky fosfátů. Současný efekt obou faktorů byl nejsilnější (Paszkowski and Boller 2002). Fenotyp *lrt1* a distribuce postranních kořenů ale byly velmi vzdálené od původního genotypu. Postranní kořeny se vytvářely vysoce větvené, krátké a vznikaly spíše ve skupinách bez náznaku klasické akropetální sekvence. Exogenní aplikace auxinu (ve formě 1-NAA; 1-naphtalene acetic acid) na klíčící semena neměla žádný vliv na obnovení tvorby postranních kořenů (Hochholdinger and Feix 1998) a nebyly pozorovány změny ani v polárním auxinovém transportu a ani v lokalizaci PIN 1 (PIN-

FORMED 1) přenašeče (Schlicht et al. 2006), jež je nepostradatelný pro iniciaci postranních kořenů (Benková et al. 2003). Zdá se tedy, že tento mutant postihuje jiné aspekty regulace vývoje postranních kořenů než je auxin a jeho polární transport. Lze tedy očekávat, že v tomto směru bude identifikace tohoto genu zajímavým příspěvkem do skupin regulačních mechanismů nezahrnujících auxin.

Předkládaná práce se nezaměřuje pouze na popis vývoje postranních kořenů, ale poskytuje celkový pohled na fenotyp *lrt1*. V pilotních experimentech ukazoval mutant změny v utváření vnější apoplastické bariéry a aerenchymu. Spolu s detekovanými změnami v proteomu (Hochholdinger et al. 2004a) ukazující na ovlivnění metabolismu polyfenolů jsme očekávali, že tento mutant bude vhodným modelem pro funkční analýzy apoplastických bariér a dalších vlastností primární kůry.

#### 1.1.4 Apoplastické bariéry

Apoplastické bariéry omezují nekontrolovaný příjem látek z prostředí. Endodermis je obecně přítomná apoplastická bariéra nacházející se na povrchu středního válce v kořenech velké části výtrusných rostlin a prakticky všech semenných rostlin (Esau 1965; Geldner 2013). Vývoj bariéry je u většiny rostlin postupný a obvykle jsou rozlišována tři stádia (Esau 1965). Casparyho proužky jsou typickým a prvním znakem vytvářející se endodermální vrstvy (Bonnett 1968). Vznikají v určité vzdálenosti od meristému a bylo zjištěno, že pro prostorovou kontrolu vývoje proužků u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) je vyžadován kontakt mezi sousedními endodermálními buňkami (Martinka et al. 2012). Lze je snadno detekovat při plazmolýze při jevu zvaném pásková plazmolýza. Ta vzniká díky těsné asociaci plazmalemy s buněčnou stěnou, které se ani při plazmolýze neodlučují (Bonnett 1968). Právě modifikací antiklinálních a transverzálních buněčných stěn a těsnou asociací s plazmatickou membránou dochází k omezení neselektivního transportu apoplastem (Alassimone et al. 2012; Enstone et al. 2003; Rufz de Lavison 1910). Casparyho proužky dělí kořen na dvě části – strana obsahující střední válec a strana vně od endodermis. Na obou stranách plazmalemy byly v kořenech huseníčku (*A. thaliana*) nalezeny transportéry vykazující protichůdnou polární distribuci, jejichž rozmístění se děje až po diferenciaci endodermis. Tato polarizace je závislá na správné funkci endocytotického cyklování membrán (Alassimone et al. 2010). Dříve se předpokládalo, že Casparyho proužky obsahují různý poměr suberinu a ligninu (Schreiber et al. 1999; Zeier et al. 1999), který je odlišný dle druhu a v závislosti na podmínkách prostředí. Novější práce využívající genetické manipulace produkce ligninu

a suberinu u huseníčku (*A. thaliana*) však spíše hovoří primárně pouze o ligninu. Nicméně svými výsledky nerozlišují a nevylučují přítomnost aromatické domény suberinu (Naseer et al. 2012). Druhým stádiem vývoje endodermis, který nastupuje až určitý čas po vytvoření Casparyho proužků, je vytvoření suberinové lamely. Ta se tvoří u huseníčku (*A. thaliana*) v jednotlivých buňkách, nezávisle na okolních a také nezávisle na vzdálenosti od meristému (Naseer et al. 2012). V kukuřici (*Zea mays*) se tvoří nejprve na vnitřních a vnějších tangenciálních stěnách a až poté v radiálních (Haas and Carothers 1975). Třetím vývojovým stádiem je pak sekundární tloušťnutí buněčné stěny, která je silnější v radiálních stěnách a slabší v tangenciálních. Dále může lignifikovat. Maturace buněk do druhého a třetího stádia je asynchronní a nejprve se objevuje proti buňkám floému (Peterson and Enstone 1996). Existuje však řada druhů, u kterých se endodermis vyskytuje pouze ve stádiu Casparyho proužků, jako např. u leknínu (*Nymphaea odorata*), modrásky (*Pontederia cordata*), vodňanky (*Hydrocharis morsus-ranae*) či blatouchu (*Caltha palustris*), (Seago et al. 1999a, 2000a; Seago et al. 2000b).

Obdobným typem bariéry je exodermis tvořící se pod pokožkou kořene většiny krytosemenných rostlin (Hose et al. 2001; Kroemer 1903; Perumalla et al. 1990; Peterson 1988; von Guttenberg 1968). Huseníček (*A. thaliana*), jež je široce využíván na výzkum endodermální vrstvy, tuto přídatnou vrstvu bohužel netvoří, a pro tuto problematiku jsou využívány jiné modelové rostliny, jako např. kukuřice (*Z. mays*), rýže (*Oryza sativa*), kosatec (*Iris germanica*), rákos (*Phragmites australis*) či cibule (*Allium cepa*), (Armstrong and Armstrong 2001; Enstone and Peterson 2005; Ma and Peterson 2000; Meyer et al. 2009; Soukup et al. 2002). Oproti relativně konzervativní struktuře endodermis se tvorba exodermis a její charakter liší u různých rostlinných druhů, kultivarů, ale i u téhož druhu v závislosti na věku a na podmínkách, ve kterých se kořen vyvíjí (viz dále). Popisuje se, že podobně jako endodermis, prochází i tato apoplastická bariéra třemi stádii vývoje (Hose et al. 2001). Ačkoliv se hovoří o exodermálních Casparyho proužcích jako o analogické struktuře k těm, které se vytváří v endodermis (Geldner 2013), zatím neexistuje příliš mnoho prací zabývajících se porovnáváním těchto struktur (Enstone et al. 2003; Meyer and Peterson 2013). Určité rozdíly byly již popsány. Oproti endodermis, exodermální Casparyho proužky se vytvářejí širší (Enstone et al. 2003). Také mezi prvním a druhým stádiem zahrnujícím vznik suberinové lamely není takový odstup, jaký je známý při formování endodermis. Často se suberinové lamely ukládají ještě než je dokončen vývoj Casparyho proužků (Peterson 1989) nebo dokonce ve stejnou dobu (Meyer et al. 2009; Seago et al. 1999b, 2000a). Některé

druhy tvoří podobně jako endodermis jen jednu exodermální vrstvu (kukuřice, *Z. mays*, rýže, *O. sativa*, cibule, *A. cepa*), (Enstone and Peterson 1997; Ma and Peterson 2000; Perumalla et al. 1990; Ranathunge et al. 2003), avšak existují druhy s více vrstvami (rákos, *P. australis*, orobinec, *Typha glauca*, *T. augustifolia*, kosatec, *I. germanica*, agáve, *Agave deserti*), (Meyer et al. 2009; North and Nobel 1995; Peterson and Perumalla 1990; Seago et al. 1999b; Soukup et al. 2002), kde vzniká nejprve vnější vrstva a následné vrstvy vznikají centripetálně (Meyer et al. 2009). Oproti endodermis, jejíž tvorba je konstitutivní, některé rostliny vytvářejí exodermis až po indukci vnějšími podmínkami, jako např. kukuřice (*Z. mays*). Vnější podmínky často určují i postup diferenciaci podél hlavní osy kořene a efektivitu vznikající bariéry (Enstone and Peterson 1997). Naopak tzv. konstitutivní vznik této apoplastické bariéry nalezneme např. u rýže (*O. sativa*) či rákosu (*P. australis*), (Ranathunge et al. 2003; Soukup et al. 2002). I jejich rozsah je však ovlivněn podmínkami prostředí a adaptací rostliny k podmínkám stanoviště. Příkladem takové adaptace jsou různé druhy kosatce (*Iris* sp.). Druhy, které rostou v půdě s nedostatkem vody, vytvářejí mnohvrstevnou exodermis a naopak druhy, vyskytující se v zatopeném substrátu, tvoří jednovrstevnou exodermální bariéru (Meyer et al. 2009).

Apoplastické bariéry se utvářejí v určité vzdálenosti od apikálního meristému hlavního kořene. Tato vzdálenost se dosti liší dle druhu a rovněž závisí na rychlosti růstu kořene (Clarkson et al. 1987; Enstone and Peterson 1992; Enstone and Peterson 1997; Ranathunge et al. 2003). Většinou se blíže apexu diferencuje endodermis a exodermis vzniká až v určité vzdálenosti od ní. U mokřadních rostlin bývá tento trend obrácený (Lichtenberková 2002; Seago et al. 1999b; Soukup et al. 2002).

Přítomnost bariéry výrazně určuje transportní parametry kořene (Baxter et al., 2009) a tím i příjem minerálních živin a vody, vstup toxických látek, patogenů nebo vznik mykorhizní kolonizace (Begg et al. 1994; Enstone et al. 2003; Lux et al. 2011; Schreiber et al. 2007). Lze předpokládat, že ovlivňují i vnitřní prostředí kořene a následně průběh vývoje pletiv, a jejich odolnost vůči nepříznivým podmínkám prostředí. Postup diferenciaci pletiv kořene probíhá v kontextu dalších vývojových událostí, které nelze považovat za zcela nezávislé. Známa je např. prostorová souvislost a koordinace mezi vznikem aerenchymu, zakládáním a růstem postranních kořenů a ukládáním suberinu v apoplastických bariérách nalezená v radiálním i longitudinálním směru u kukuřice (*Z. mays*) a rákosu (*P. australis*), (Armstrong et al. 2000; Enstone and Peterson 1997; Seago et al. 1999b; Soukup et al. 2002). Výsledky z kukuřice (*Z. mays*) pěstované ve vermikulitu ukazují, že v mladších oblastech,

poblíž kterých mají v budoucnu prorůstat postranní kořeny, se v endodermis nacházejí tzv. propustné buňky bez suberinových lamel. Tyto buňky jsou navíc seřazeny radiálně s buňkami v exodermis, u kterých je také zpožděna tvorba suberinové lamely (Enstone and Peterson 2005). Koordinace vývoje postranních kořenů a nemodifikované exodermis byla popsána i u rákosu (*P. australis*), (Armstrong et al. 2000; Soukup et al. 2002). Tyto oblasti jsou nazývány „okna“ a zřejmě slouží k usnadnění prorůstání postranních kořenů. Následkem stresu se mohou tato místa, nacházející se proti prorůstajícím primordiím, suberinizovat, popř. lignifikovat v důsledku poškození. Tím dojde k jakémusi uvěznění primordií uvnitř mateřského kořene a ty pak prorůstají podél osy skrz vrstvy primární kůry (Armstrong et al. 1999; Armstrong and Armstrong 2001).

Na počátku práce jsme vycházely z hypotézy, že pokud mutací došlo k ovlivnění schopnosti mutanta efektivně regulovat vnitřní prostředí, mohl by být výrazně ovlivněn průběh diferenciaci i dalších pletiv, včetně vývoje postranních kořenů od jejich iniciace až po způsob pronikání mateřskými pletivy. Předkládaná práce proto poskytuje vedle hodnocení průběhu iniciace a růstu postranních kořenů také zhodnocení vývoje okolních pletiv a srovnává tyto procesy navzájem. V průběhu práce se ukázalo, že mutace ovlivňuje celou řadu dalších parametrů v silné závislosti na podmínkách prostředí, a tedy, že mutant není vhodný model pro rozsáhlejší studii apoplastických bariér. Navíc z důvodu stále nedokončené identifikace genu způsobující tuto mutaci jsme upustili od této původně plánované části a plně dokončili pouze část zaměřenou na postranní kořeny. Vzhledem k vysoké variabilitě a výrazným problémům s kultivací *lrt1* rostlin z heterogenní populace semen, zejména jeho vysokou citlivostí k podmínkám prostředí, byla část věnovaná vývoji hypodermálních vrstev následně řešena na jiném ekotypu kukuřice (*Z. mays*).

### 1.1.5 Vliv podmínek prostředí na vývoj apoplastických bariér

Tato problematika byla již mnohokrát publikována s použitím různých podmínek prostředí, i různých druhů rostlin. Velké rozdíly byly nalezeny mezi utvářením endodermis a exodermis např. za použití hydroponie s odlišnou dostupností kyslíku, aeroponie (Enstone and Peterson 1998, 2005; Zimmermann et al. 2000; Zimmermann and Steudle 1998), vermikulitu (Enstone and Peterson 1998; Schreiber et al. 2007) a agaru (Soukup et al. 2004). Další popsané stresory ovlivňující tvorbu těchto vrstev jsou sucho (Enstone et al. 2003), salinita (Karahara et al. 2004; Shen et al. 2014; Schreiber et al. 2007), těžké kovy (Degenhardt and Gimmler 2000; Lux et al. 2011), nedostatek živin (Schreiber et al. 2007),



acidita, patogeny (Enstone et al. 2003), teplota (Armstrong et al. 1999), fytotoxiny (Armstrong and Armstrong 2001; Armstrong et al. 2000) a mechanický odpor substrátu (Meyer et al. 2009; Seago et al. 2000b). Rozdíly se pak projevují na rozvoji jednotlivých bariér v daném místě, v chemickém složení, v tloušťce Casparyho proužků v radiálních stěnách, podél samotného kořene a ve vzdálenosti jejich tvorby od vrcholu kořene (Armstrong et al. 2000; Colmer 2003; Colmer et al. 1998; Enstone and Peterson 2005; Enstone et al. 2003; Karahara et al. 2004; Meyer et al. 2009; Schreiber et al. 2005; Schreiber et al. 1999; Soukup et al. 2004).

### 1.1.6 Apoplastické bariéry se vytvářejí nejen v hlavních kořenech

Dosud se naprostá většina prací zaměřovala pouze na hlavní kořen a ostatní části kořenového systému byly opomíjeny. Odlišné reakce na úrovni apoplastických bariér byly pozorovány u ječmene (*Hordeum vulgare*), kde v seminálních a první generaci nodálních kořenů nebyla exodermis detekovatelná a utvářela se až v dalších generacích nodálních kořenů (Gierth et al. 1999; Lehmann et al. 2000). Ačkoliv postranní kořeny tvoří převážnou a velmi důležitou část kořenového systému, jsou zmínky o nich ve většině případů velmi kusé a nesystematické. Převážnou část informací tvoří výsledky z pokusů, při kterých byly použity apoplastické sondy (Aloni et al. 1998; Soukup et al. 2002; Yamaji and Ma 2007) se zaměřením na porovnávání propustností mezi hlavním kořenem a postranními kořeny (Aloni et al. 1998) nebo se zabývají otázkou, zdali se dostávají látky přes mezery vzniklé při emergenci postranního kořene (Peterson et al. 1981), či barvička z okolního prostředí prostupuje celý postranní kořen a jeho cévními svazky se dostává dovnitř mateřského kořene (Enstone and Peterson 1998; Faiyue et al. 2010; Soukup et al. 2002). Většina těchto informací se však zaměřuje na endodermis, výsledky jsou často protichůdné (Aloni et al. 1998; North and Nobel 1996) a obsahují mnohdy pouze informaci o ne/přítomnosti dané bariéry (Peterson and Lefcourt 1990). Histochemická detekce ligninu či suberinu (Soukup et al. 2002) nebo stádium vývoje bariéry (Reinhardt and Rost 1995) bývají uváděny pouze velmi sporadicky. Informace o exodermis jsou u kořenů vyšších řádů naprosto výjimečné. Přítomnost exodermis byla popsána v kukuřici (*Zea mays*), (Redjala et al. 2011; Wang et al. 1995), histochemicky detekována u rákosu (*Phragmites australis*), (Soukup et al. 2002), naopak v rýži (*Oryza sativa*) nebyla v jedné studii pozorována (Faiyue et al. 2010), ale v druhé byla detekována (Yamaji and Ma 2007). Jediné detailnější informace pocházejí ze studia tlustých postranních kořenů agáve (*Agave deserti*) či citrusu (*Citrus sp.*). Při studiu postranních kořenů agáve byly

popsány rozdíly v počtu vytvořených exodermálních vrstev v závislosti na trvání sucha (North and Nobel 1991) a na citrusech byly srovnávány rozdíly ve vývoji suberinové lamely mezi jednotlivými řády postranních kořenů a též mezi třemi různými druhy (Huang and Eissenstat 2000).

Z důvodů velmi kusých a často nesourodých informací jsme do našeho studia zahrnuli celý kořenový systém kukuřice (*Z. mays*) s inducibilním charakterem exodermis a studie zahrnuje škálu nejčastěji se vyskytujících experimentálních podmínek, jakými jsou provzdušňovaná hydroponie, hydroponie se sníženou dostupností kyslíku, organické kyseliny v kombinaci s hypoxií, zasolení, různé koncentrace těžkých kovů, půda, zaplavená půda a perlit s pískem zalévaný pouze vodovodní vodou za účelem sledování nízkého vodního potenciálu a možného nedostatku určitých živin. Jako modelový organismus pro tuto část jsme zvolili v naší laboratoři prověřený genotyp Cefran (Hlavatá 1992; Husáková 2006; Lenochová 2004), jež nevykazuje negativně ovlivněný vývoj postranních kořenů. Cílem této části bylo zdokumentovat variabilitu apoplastických bariér v rámci kořenového systému v různých podmínkách prostředí. Tato data byla navíc spojena s detailní analýzou růstu a větvení postranních kořenů.

### 1.1.7 Testování propustnosti apoplastu

Testy propustnosti povrchu kořene jsou technikou užívající se více než století (Rufz de Lavison 1910), která nám umožňuje detekovat pohyb látek apoplastickou dráhou v rostlinných pletivech. Tyto látky jsou označovány jako tzv. apoplastické sondy. Ačkoliv u většiny z nich je známo chování, které takto striktně vyhraněnému označení neodpovídá, pro snadnější orientaci v tomto textu se tohoto označení budeme nadále držet. Apoplastické sondy jsou látky, jejichž vlastnosti jim umožňují pohybovat se pouze v apoplastu a neměly by přecházet snadno přes plazmatickou membránu. Sondy aplikované většinou ve formě určitého roztoku na testovaná pletiva je pak možné následně detekovat. Tím získáváme poziční informaci o ne/propustnosti apoplastu daného vzorku. Jejich pohyb samozřejmě silně závisí na velikosti molekuly sondy a jejího náboje, jelikož apoplast může obsahovat velké množství negativně nabitých molekul. K testování se užívají jednak malé anorganické látky, jako  $\text{Fe}^{2+}$  či kyselina jodistá, které se svými vlastnostmi podobají solutům obsaženým v půdním roztoku. Jako apoplastické sondy jsou často využívány i větší fluorescentní látky, jako např. rostlinný alkaloid berberin, calcofluor či PTS (trisodium 3-hydroxy-5,8,10-

pyrenetrisulfonát). Uvedené sondy jsou odlišné svými vlastnostmi, s kterými jsou spojené i různé limitace v jejich použití.

V průběhu studia apoplastických bariér jsme zjistili, že ačkoliv testy propustnosti jsou velmi často používaná a celkem jednoduše proveditelná technika, výsledky v jednotlivých pracích jsou často velmi odlišné. Proto jsme doplnili anatomickou část o metodické srovnání, které je klíčové i pro správnou interpretaci získaných výsledků. Vybraná barviva jsme otestovali na kořenech kukuřice (*Zea mays*) s indukovanou tvorbou exodermis a na kořenech rýže (*Oryza sativa*), která vytváří konstitutivní, silnější exodermální bariéru. V souhrnu diskutujeme o důležitém kroku výběru vhodného činidla a jeho koncentrace pro daný druh rostliny, její stáří a typ kořene. Jelikož neexistuje jednoduché pravidlo výběru, souhrn obsahuje pozitiva i negativa využití jednotlivých sond.

Z výše uvedených důvodů je práce členěna do tří víceméně samostatných částí zahrnujících anatomicko-morfologickou studii mutanta *lrt1* za různých kultivačních podmínek, popis vývoje apoplastických bariér v rámci celého kořenového systému kukuřice (*Z. mays*) za různých podmínek prostředí a zhodnocení různých testů propustnosti používaných v literatuře zahrnující diskuzi o možnostech jejich použití/ jejich limitace se zahrnutím vlastních výsledků.

## 1.2 Cíle práce

### I. Hlavním cílem je detailní analýza kořenového systému mutantu *lrt1* kukuřice (*Zea mays*)

#### Dílčí cíle:

- Detailně zdokumentovat vývoj postranních kořenů u *lrt1*, jejich anatomii v různých stádiích vývoje, způsob pronikání z hlavního kořene a jejich následný růst při variabilních podmínkách kultivace
- Kvantifikovat iniciaci a růst postranních kořenů *lrt1* a původního genotypu podél hlavní osy primárního kořene
- Zhodnotit postup diference povrchových vrstev kořene; srovnat vývoj a funkci exodermálních vrstev *lrt1* a normálního genotypu za různých podmínek prostředí a jejich možného vlivu na prorůstání postranních kořenů
- Popsat rozdíly v propustnosti exodermis v závislosti na prostorovém uspořádání jednotlivých složek exodermálních buněčných stěn
- Porovnat adaptační mechanismy na podmínky prostředí mezi *lrt1* a původním genotypem a zhodnotit rozdíly mezi nimi.

### II. Hlavním cílem je dokumentace struktury a funkce apoplastických bariér v rámci celého kořenového systému kukuřice (*Z. mays*) za různých podmínek prostředí

#### Dílčí cíle:

- Porovnat rozdíly v rozsahu vytváření endodermis a exodermis v různých typech kořenů (primární kořen, postranní kořeny různých řádů, adventivní nodální kořeny) a při působení různých podmínek prostředí
- Detailně zdokumentovat vývoj apoplastických bariér v postranních kořenech různé délky a stáří při působení různých stresových faktorů

- Zhodnotit rozdíly v propustnosti povrchových vrstev různých typů kořenů a za různých podmínek prostředí.

### **III. Hlavním cílem je porovnání jednotlivých typů apoplastických tracerů užívaných v literatuře a otestování vybraných sond na vybraném rostlinném materiálu**

#### **Dílčí cíle:**

- Porovnat charakteristiky jednotlivých apoplastických sond používaných v literatuře a zhodnotit rozdíly v popsáních výsledcích
- Vybrat vhodné zástupce jednotlivých typů sond a vyzkoušet, popř. modifikovat metodiku na zvoleném rostlinném materiálu
- Porovnat získané výsledky s literaturou a vyhodnotit vliv materiálu, použitého typu sondy a zvolené koncentrace.

## **2. MATERIÁL A METODY**

Ačkoliv je tato dizertační práce rozdělena do tří víceméně samostatných částí, metody zahrnující např. kultivace rostlin a základní anatomické a histochemické postupy jsou shodné. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla namísto opakovaného vypisování totožných metod v jednotlivých sekcích, pojmout tuto část dizertační práce jako celkové shrnutí. Pokud ale šlo vyloženě o samostatnou metodu použitou jen v dané části, použila jsem označení jednotlivých kapitol obsahujících konkrétní článek/manuskript.

### **2.1 Rostlinný materiál**

Kořenový systém kukuřice seté, *Zea mays* L., B73 genotyp a mutant *lrt1* (kap. 3.1.2); *Zea mays* L., cv. Cefran (kap. 3.2.2, 3.3.2); rýže seté, *Oryza sativa japonica*, var. Nipponbare (kap. 3.3.2).

### **2.2 Typy kultivací a kultivační podmínky**

Semena kukuřice (*Z. mays*) byla klíčena mezi listy filtračního papíru po čtyři dny, při 27 °C, ve tmě. U semen mutanta *lrt1* (kap. 3.1.2) byla semena před klíčením čtyři dny jarovizována v lednici při 4 °C pro lepší synchronizaci klíčení. Semena rýže (*O. sativa*), (kap. 3.3.2) byla klíčena sedm dní ve vodě na světlém místě pokojové teploty. Rostliny s primárními kořeny (2 - 5 cm) byly přeneseny do kultivačních nádob a kultivovány v růstové komoře s fotoperiodou 16/8, ozářením 435 W.m<sup>-2</sup>, relativní vlhkostí vzduchu 50 - 75 % a teplotní periodou 22/18 °C den/noc. Čtvrtinový živný roztok Hoagland 3 (Hoagland and Amon 1950) byl doplněn mikroprvky (Arnon 1938) a Fe<sup>3+</sup> citrátem, popř. ještě agarem, organickými kyselinami, NaCl, nebo Cd<sup>2+</sup> (detailní složení a koncentrace viz kap. 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2). Živný roztok byl měněn každý týden. Pro krátkodobou kultivaci byly použity 5 L (kap. 3.1.2), popř. 12 L nádoby (kap. 3.2.2, kap. 3.3.2), pro dlouhodobou 80 L (kap. 3.1.2). V případě kultivací v půdě či perlitu byly rostliny pěstovány v 1 L nádobě v experimentálním skleníku (kap. 3.2.2). Rostliny byly pěstovány buď mezi listy filtračního papíru (Lenochová et al. 2009), (kap. 3.1.2), v zavzdušňované hydroponii (kap. 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2), stagnantní hydroponii (kap. 3.1.2) utužené agarem (kap. 3.2.2), ve vlhké či zaplavené půdě nebo v perlitu s pískem (kap. 3.2.2). Rostliny kukuřice (*Z. mays*) byly zpracovány ve stáří 16 dní (kap. 3.1.2, 3.3.2), 18 dní (kap. 3.2.2), popř. až při květu cca po čtyřech měsících při dlouhodobé kultivaci (kap. 3.1.2). Rostliny rýže (*O. sativa*) byly staré 46 dní (kap. 3.3.2).

## **2.3 Zpracování materiálu**

Výběr jednotlivých typů kořenů, stejně tak pozic podél kořene a počet opakování se liší mezi jednotlivými sekcemi podle následného zpracování, a proto jsou uvedeny až u jednotlivých výsledků ve člancích/manuskriptech (kap. 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2).

### **2.3.1 Ruční řezy**

Vybrané vzorky kořenů byly fixovány v 4 % paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (0.05 M, pH 6.8) a pomocí ručního mikrotomu byly připraveny příčné 50 – 150  $\mu\text{m}$  tlusté řezy. Řezy byly dle potřeby barveny pomocí Sudan Red 7B (0.01 % w/v; 1 h), směsí 1 % HCl a 12 % Floroglucinolu (3 min) nebo Berberin hemisulfátu (0.1 % aq.; 1 h) s Genciánovou violetí (0.05 % aq.; 10 min) pro zhašení autofluorescence (Brundrett et al. 1991; Jensen 1962). Vzorky byly následně pozorovány v 65 % glycerolu (popř. okyseleném glycerolu po barvení HCl – Floroglucinol). Jako kontrola sloužily nebarvené řezy pozorované ve světlém poli nebo s využitím příslušné fluorescence.

### **2.3.2 Trvalé preparáty**

Vybrané vzorky byly fixovány v 50 % FAA (formaldehyd – kyselina octová – ethanol) a po odvodnění (Němec 1962) zality do histoplastu. Sériové podélné a příčné řezy tlusté 10  $\mu\text{m}$  připravené na rotačním mikrotomu byly barveny Safraninem O a Fast Green FCF (Johansen 1940), (kap. 3.1.2).

### **2.3.3 Příprava vzorků pro TEM**

Vzorky kořenů velikosti max 3 x 3 mm byly fixovány ve 2.5 % glutaraldehydu v kakodylátovém pufru (0.1 M, pH 7.2) a postfixovány pomocí 2 % (w/v) osmium tetroxidem ve stejném pufru. Poté byly infiltrovány v osmi krocích (12 h/krok) do pryskyřice LR white s přidaným katalyzátorem 0.5 % benzyl peroxidem a nechány polymerovat přes noc při 60 °C bez přístupu vzduchu. Z bločků byly následně vytvořeny polotenkové řezy (2 – 3  $\mu\text{m}$ ). Řezání ultratenkých řezů a kontrastování pomocí osmia bylo provedeno v servisním pracovišti Elektronové mikroskopie, Viničná 7, Praha. Vzorky byly pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu (kap. 3.2.2).

### 2.3.4 Příprava vzorků pro SEM

Vybrané 1 cm dlouhé úseky hlavních kořenů byly fixovány v 2.5 % glutaraldehydu v kakodylátovém pufru (0.1 M, pH 7.2; 24 h), poté dehydratovány pomocí ethanol-acetonové řady, přeneseny do terciárního butanolu, vakuově vysušeny a pozlaceny (Sputter Coater SCD 050, Bal-Tec). Následně byly pozorovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu (kap. 3.1.2).

### 2.3.5 Projasnění kořenů

Kořenové špičky byly projasněny pomocí NaI (Soukup and Tylová 2014) a barveny Propidium jodidem (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a Hoechstem 33258 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Takto připravené vzorky byly pozorovány v konfokálním mikroskopu (kap. 3.1.2).

### 2.3.6 Aktivita peroxidázy

Aktivita peroxidázy byla detekována histochemicky na ručních řezech (kap. 3.1.2). Reakční směs obsahující 1 mL acetátového pufru (0.1 M, pH 5) s 282  $\mu\text{l}$  směsí DAB (0.78 mg/mL),  $\text{NiCl}_2$  (4 mg/mL) a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.03 mg/mL) byla aplikována na řezy po dobu 1 h, ve tmě a při 35 °C. Na kontrolní řezy nebyl použit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , popř. byl aplikován phenylhydrazin k inhibici peroxidázy (5 min; 0.1 % v PBS), (Pearse, 1968).

### 2.3.7 Test propustnosti a hodnocení

Permeabilitní testy byly použity ve všech sekcích. Vzhledem k tomu, že charakteristiky jednotlivých apoplastických sond, včetně postupu jejich použití jsou velmi detailně komentovány v kap. 3.3, není zde tato část více rozvedena.

### 2.3.8 Analýza jednotlivých vývojových stádií a kvantifikace primordií/ postranních kořenů

Jednotlivá vývojová stadia postranních kořenů byla kvantifikována na podélných seriových trvalých preparátech vytvořených z 1 cm dlouhých kořenových segmentů (kap. 3.1.2). Četnost iniciací postranních kořenů byla vyjádřena jako “lateral root initiation index:  $I_{\text{LRI}} = 100 \cdot d \cdot l$ , d: hustota iniciačních událostí postranních kořenů (počet/mm), l: průměrná délka plně prodloužených buněk primární kůry (mm),” (Dubrovsky et al., 2009).



### **2.3.9 Kvantifikace ligninu**

Vzorky (kap. 3.1.2) byly vysušeny při 60 °C a zhomogenizovány. Buněčné stěny byly vyčištěny (Selvendran, 1975) a následně inkubovány s kyselinou thioglykolovou (Bruce and West, 1989). LTGA (Lignin Thioglycolic Acid Derivates) byly extrahovány z buněčných stěn a měřeny spektrofotometricky (Helios  $\alpha$ , Unicam, Cambridge, UK) při 280 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako absorbance/suchá hmotnost vyčištěných buněčných stěn (Lange et al., 1995).

### **2.3.10 Hodnocení distribuce Casparyho proužků a suberinových lamel**

Distribuce buněk v endodermis a exodermis obsahující Casparyho proužky, popř. suberinové lamely byla hodnocena semikvantitativně. Bylo vytvořeno pět kategorií podle výskytu (0 – žádné buňky neobsahovaly danou modifikaci, 5 – všechny buňky), (detailní informace viz kap. 3.2.2).

### **2.3.11 Obrazová analýza**

Obrazová analýza v softwaru NIS Elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging; <http://www.nis-elements.com>) byla využita pro zhodnocení radiální tloušťky Casparyho proužků v endo/exodermis (kap. 3.2.2) a stanovení pohybu apoplastické sondy primární kůrou (kap. 3.2.2). Také byla použita pro manuální změření celkové délky hlavních kořenů (kap. 3.1.2, 3.2.2) a pro změření délky postranních kořenů druhého a třetího řádu (kap. 3.2.2). Morfologická analýza postranních kořenů prvních řádů byla provedena poloautomaticky v softwaru Image J 1.49d, plugin Smart Root (National Institute of Mental Health; <http://imagej.net>), (kap. 3.2.2).

### **2.3.12 Mikroskopie**

Pro většinu pozorování byl použit mikroskop Olympus BX51 (Olympus Copr., Tokyo, Japan) v režimu světlého pole, DIC, případně fluorescence s kostkou pro UV (Olympus U-MWU) a modrou excitaci (Olympus U-MWB). Dokumentace byla provedena pomocí digitální kamery Apogee U4000 (Apogee Imaging Systems, Inc., Roseville, CA, USA). Z dalších mikroskopických technik byl využit konfokální laser-skenovací mikroskop (TCS SP2, Leica, Mannheim, Germany), skenovací elektronový mikroskop (JEOL JSM-6380LV, Tokyo, Japan) a transmisní elektronový mikroskop (JEOL 1011, Tokyo, Japan) s digitální kamerou Veleta CCD a softwarem Olympus Soft Imaging Solution GmbH.

### **2.3.13 Statistické analýzy**

Ke statistickému zhodnocení výsledků byl použit program NCSS 2001 (Jerry Hintze, Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA). V kapitole 3.1.2 byl užit dvouvýběrový t-test a v případě dat bez normální distribuce Mann-Whitney/Wilcoxon, popř. Kolmogorov-Smirnov neparametrický test. Pro otestování rozdílů v podílu jednotlivých vývojových stádií primordií/postranních kořenů v dané pozici kořene byl využit Hotellingův dvouvýběrový t-test (Hotelling 1931). Pro udržení p-hladiny u nezávislých vzorků byla využita metoda Bonferroni-Holm (Holm 1979). V kapitole 3.2.2 byla použita GLM Anova pro analýzu vlivu vzorku/ošetření/interakcí. Následné rozdíly byly dále analyzovány pomocí Bonferroniho mnohonásobného srovnávacího testu. Korelace byly zhodnoceny přes Correlation Matrix (Spearman Correlation Coefficient). Chybové úsečky označují střední chybu průměru.

### **3. SOUHRN VÝSLEDKŮ PRÁCE**

#### **3.1 Analýza kořenového systému mutanta *lrt1* kukuřice (*Zea mays*)**

Při studiu mutanta *lrt1* kukuřice (*Z. mays*) jsme se neomezili pouze na kořenovou část, ale sledovali jsme vliv této mutace na úrovni celé rostliny. Naše výsledky ukazují, že mutace ovlivňuje celkový habitus rostlin. Obecně jsou nižšího vzrůstu a hůře snášejí nepříznivé podmínky prostředí, jako např. útoky patogenů či nedostatečné provzdušnění média. Rostliny často vykazují sterilitu.

Na základě detailní analýzy kořenového systému s využitím různých typů kultivací jsme zjistili, že mutace způsobuje vyšší citlivost *lrt1* rostlin k různým podmínkám prostředí, což mělo zejména dopad na zpožděný vývoj a poškození postranních kořenů. Na samotnou frekvenci zakládání primordií, jak bylo původně předpokládáno, však mutace vliv nemá. Je proto třeba přehodnotit využití tohoto mutanta, jež nadále nemůže být užíván jako „kontrolní“ varianta nevytvářející postranní kořeny v časném postembryonálním vývoji pro proteomické a genomické studie. Bližší anatomická studie jednotlivých stádií vývoje postranních kořenů ukázala, že primordia v mutantních rostlinách vykazují poruchy v uspořádání jednotlivých vrstev, jsou širší na bázi, s častými lignifikacemi. Samotná vznikající struktura budoucího apikálního meristému postranního kořene je silně ovlivněná, což může mít za následek pozorované změny i při prorůstání pletivy hlavního kořene. Je však možné, že právě problémy s prorůstáním negativně ovlivňují strukturu vznikajícího meristému. Také samotné vynoření postranních kořenů neprobíhá, ve srovnání s původním genotypem, tradičním způsobem a pokud k němu dojde, tyto kořeny ukončují velmi záhy svůj růst.

Oproti postranním kořenům nevykazují hlavní kořeny výrazné změny v organizaci meristému. Nicméně i tento typ kořenů je mutací ovlivněn, jelikož v určité vzdálenosti od apikálního meristému jsme zaznamenali poruchy v organizaci povrchových a podpovrchových vrstev. Ty byly nejrozsáhlejší zejména ve starších, plně diferencovaných částech kořenů. Výsledky z anatomických a histochemických pozorování těchto míst jsme korelovali s testy propustnosti buněčných vrstev při použití kyseliny jodisté jako sondy propustnosti povrchu kořene. To ukázalo zajímavý vzorec diferenciačních změn v těchto povrchových vrstvách kořene *lrt1*, kde bylo vidět, že funkce sledovaných vrstev je v mutantních kořenech změněná oproti normálnímu genotypu. Mezi nejmarkantnější změny v diferenciaci můžeme jmenovat zvýšenou lignifikaci, depozici polyfenolických látek

a zvýšenou aktivitu peroxidázy. Indukovaná lignifikace a zvýšená aktivita peroxidázy byla taktéž pozorována v pericyklu, v místech potenciálního vzniku primordií a kolem již vzniklých primordií. Kvantitativní změny v celkovém obsahu ligninu mutantu oproti původnímu genotypu však nebyly statisticky průkazné.

### **3.1.1 Podíl práce**

Veškeré experimentální práce včetně sepsání manuskriptu jsem provedla sama, s konzultační pomocí Dr. Soukupa a Prof. Hochholdingera.

### **3.1.2 Publikace**

Výsledky z této kapitoly jsou součástí publikace: Husáková, E., Soukup, A., Hochholdinger, F. (2013). "Lateral root development in the maize (*Zea mays* L.) *lateral rootless 1* mutant." *Annals of Botany* 112(2): 417 - 428.

PART OF A SPECIAL ISSUE ON MATCHING ROOTS TO THEIR ENVIRONMENT

## Lateral root development in the maize (*Zea mays*) *lateral rootless1* mutant

Eva Husakova<sup>1</sup>, Frank Hochholdinger<sup>2</sup> and Ales Soukup<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Plant Biology, Charles University in Prague, Vinicna 5, Prague, Czech Republic and  
<sup>2</sup>Institute of Crop Science and Resource Conservation, University of Bonn, Friedrich-Ebert-Allee 144, Bonn, Germany  
\* For correspondence. E-mail [asoukup@natur.cuni.cz](mailto:asoukup@natur.cuni.cz)

Received: 17 October 2012 Returned for revision: 13 November 2012 Accepted: 14 January 2013

- **Background and Aims** The maize *lrt1* (*lateral rootless1*) mutant is impaired in its development of lateral roots during early post-embryonic development. The aim of this study was to characterize, in detail, the influences that the mutation exerts on lateral root initiation and the subsequent developments, as well as to describe the behaviour of the entire plant under variable environmental conditions.
- **Methods** Mutant *lrt1* plants were cultivated under different conditions of hydroponics, and in between sheets of moist paper. Cleared whole mounts and anatomical sections were used in combination with both selected staining procedures and histochemical tests to follow root development. Root surface permeability tests and the biochemical quantification of lignin were performed to complement the structural data.
- **Key Results** The data presented suggest a redefinition of *lrt1* function in lateral roots as a promoter of later development; however, neither the complete absence of lateral roots nor the frequency of their initiation is linked to *lrt1* function. The developmental effects of *lrt1* are under strong environmental influences. Mutant primordia are affected in structure, growth and emergence; and the majority of primordia terminate their growth during this last step, or shortly thereafter. The lateral roots are impaired in the maintenance of the root apical meristem. The primary root shows disturbances in the organization of both epidermal and subepidermal layers. The *lrt1*-related cell-wall modifications include: lignification in peripheral layers, the deposition of polyphenolic substances and a higher activity of peroxidase.
- **Conclusions** The present study provides novel insights into the function of the *lrt1* gene in root system development. The *lrt1* gene participates in the spatial distribution of initiation, but not in its frequency. Later, the development of lateral roots is strongly affected. The effect of the *lrt1* mutation is not as obvious in the primary root, with no influences observed on the root apical meristem structure and maintenance; however, development of the epidermis and cortex are impaired.

**Key words:** *Zea mays*, *lrt1*, lateral root, lateral root emergence, root apical meristem, lignin, peroxidase.

### INTRODUCTION

Lateral roots (LRs) typically form the major portion of the root systems of vascular plants. Root system architecture, which is shaped by root branching, is one of the key agronomic parameters determining the uptake of water, nutrients and other substances, as well as the eco-physiological relationships with the rhizosphere.

LRs are mostly formed postembryonally in the subapical zone of the parent root (Esau, 1965). Their development has been studied in detail in the *Arabidopsis thaliana* dicot model, primarily due to its simple and experimentally accessible root system. Initiation of its LRs takes place in the protoxylem sector of the pericycle, and is normally divided into eight steps, including formation of founder cells, anticlinal and periclinal divisions, as well as the activation of a new apical meristem during emergence from the maternal root tissues (Malamy and Benfey, 1997). LR initiation in more complex (and agronomically important) model plants such as the monocot cereals maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) differ to some extent. In maize, LR initiation takes place opposite from the phloem poles of the polyarch stele (Bell and McCully, 1970; Jansen *et al.*, 2012). Most of the young LRs are formed from pericycle cells, except for

the temporary early root cap of endodermal origin, which are later replaced by the activity of the root apical meristem initials (Clowes, 1978). The heterogeneity of the cereal root system and its development is reflected in the specific root-type regulatory mechanisms (Majer and Hochholdinger, 2011).

Intrinsic mechanisms provide a baseline of the root system's architectural set-up. Auxin plays a pivotal role in root development by interacting with other plant growth regulators, as well as other regulatory factors (Tung *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2010; Kapulnik *et al.*, 2011; Smith and De Smet, 2012). External factors allow for a modification of the intrinsic programme within the limits of developmental plasticity (Malamy, 2005), in order to adjust to and cope with the conditions of the environment.

There are a plethora of root development mutants in *A. thaliana*, yet only a limited number of root mutants are currently available for other plant species. Study of the interspecific differences in root development are of particular value. The tomato (*Lycopersicon esculentum*) mutant *dgt* (*diageotropica*) does not generate LRs as a result of changes in auxin signalling (Muday *et al.*, 1995; Lavy *et al.*, 2012). Similarly, rice (*Oryza sativa*) mutants without LRs were described as *lrt1* (*lateral rootless 1*; Chhun *et al.*, 2003b), *lrt2* (*lateral rootless 2*;

Wang *et al.*, 2006) and *RM109* (Rice Mutant 109; Hao and Masahiko, 1999). Moreover, rice mutants with reduced numbers of LRs include *arm1*, *arm2* (*auxin-resistant mutant 1* and *2*; Chhun *et al.*, 2003a), and *crl1* (*crown rootless 1*; Inukai *et al.*, 2005). Lastly, several mutants with defects in their LR development have been identified in maize (*Zea mays*), including the mutants *slr1*, *slr2* (*short lateral roots 1* and *2*; Hochholdinger *et al.*, 2001), *rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*; Woll *et al.*, 2005) and *lrt1* (*lateral rootless 1*; Hochholdinger and Feix, 1998).

The monogenic and recessive mutant *lrt1* was isolated from a segregating  $F_2$ -generation of an EMS (ethyl methane sulfonate) mutagenized population (Hochholdinger and Feix, 1998) of the B73 inbred line, due to its conspicuous phenotype. The *lrt1* mutant is deficient in LR formation during its early postembryonic development (Hochholdinger and Feix, 1998). Partial recovery was reported in the presence of arbuscular mycorrhiza, and was further pronounced in the presence of a high phosphate concentration (Paszkowski and Boller, 2002). However, such LRs were short, highly branched, and with a distribution along the primary root far from the normal acropetal sequence. The mutant phenotype does not seem to be directly related to auxin signalling; it was not reversed by exogenous application of auxin (Hochholdinger and Feix, 1998), nor were any disturbances in the PIN1 efflux transporter localization observed (Schlicht *et al.*, 2006). Based on an analysis of *lrt1*, the role of the *ZmGSL* (*Gibberellic Acid Stimulated-Like*) gene family, during formation of LR primordium, was revealed (Zimmermann *et al.*, 2010).

Detailed histological studies of this mutant, presented here, provide further insights into the function of the *lrt1* gene, which is used as a reference lateral rootless material (Hochholdinger *et al.*, 2004a; Park *et al.*, 2004; Schlicht *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2010) for studies of maize root development.

## MATERIAL AND METHODS

### *Plant materials and growth conditions*

Seeds of a segregating *Zea mays lrt1* and wild-type (B73 genotype) were imbibed for 4 d at 4 °C, and then germinated on moist filter paper in the dark at 27 °C for 4 days. Seedlings with approx. 2 cm primary root were mounted into 5-litre containers in the growth chamber (16/8-h photoperiod; irradiation 435 W m<sup>-2</sup> photosynthetically active radiation; 22/18 °C day/night; relative humidity approx. 50 %). Quarter-strength Hoagland 3 solution (Hoagland and Amon, 1950), supplemented with microelements [120 nM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 360 nM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 5 nM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3 nM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.9 nM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Arnon, 1938) and 10 μM Fe<sup>3+</sup> citrate (pH 5.3–5.5)], was used and changed weekly. The plants were either cultivated between moist sheets of filter paper (Lenochová *et al.*, 2009) or cultivated using hydroponics, which was either constantly aerated (dissolved oxygen saturation ≥60 %) or stagnant (in which the oxygen content during 3 days gradually decreased to 5–10 % of saturation). The plants were harvested 16 days post germination, scanned, and the shoot and root lengths were measured.

Long-term hydroponics was carried out in a greenhouse in 80-litre reservoirs, with internal circulation of the solution (dissolved oxygen saturation ≥75 %) for approx. 130 days until flowering. The composition of the nutrient solution was identical to that of the short-term cultivations. It was changed every other week, with the microelements and iron supplemented weekly.

### *Anatomy and histochemistry*

Samples from selected positions of the primary roots from 16-d-old plants were either fixed in 50 % FAA for the permanent sections, or in 4 % formaldehyde in phosphate buffer (0.05 M, pH 6.8) for the free-hand sections. Selected segments of the primary root were embedded into histoplast and longitudinal as well as transversal sections (10 μm) were cut; they were then stained with Safranin O and Fast Green FCF (Johansen, 1940). Quantitative image analyses were performed using NIS Elements software (Laboratory Imaging; <http://www.nis-elements.com/>).

Free-hand transverse sections (approx. 150 μm) were stained in Sudan Red 7B (0.01 %, w/v) (Brundrett *et al.*, 1991), HCl-phloroglucinol (Jensen, 1962), and berberine hemisulfate (0.1 % aq.; UV Olympus U-MWU filter block) (Brundrett *et al.*, 1988); and counterstained with Crystal Violet (0.05 % aq., 10 min, for quench autofluorescence; Grubler). Unstained control sections were surveyed in bright field or UV-excited autofluorescence.

Peroxidase activity was detected histochemically on free-hand sections after 2 h of formaldehyde fixation, as described above. Reaction mixtures containing 1 mL acetate buffer (0.1 M, pH 5) with a 282-μL mixture of diaminobenzidine (0.78 mg mL<sup>-1</sup>), NiCl<sub>2</sub> (4 mg mL<sup>-1</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.03 mg mL<sup>-1</sup>) was applied to sections for 1 h at 35 °C in the dark. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was omitted from control sections, and peroxidase inhibition with phenylhydrazine (5 min; 0.1 % in phosphate-buffered saline) was alternatively used (Pearse, 1968).

The permeability of intact root surfaces was probed for 1 h with periodic acid 0.02 % aq. solution, and penetration of the solution from the surroundings was localized on free-hand sections, as previously described (Soukup *et al.*, 2007). Control sections were processed without periodic acid oxidation.

Sections were observed with an Olympus BX51 microscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan) (differential interference contrast, epifluorescence), and documented with an Apogee U4000 digital camera (Apogee Imaging Systems, Inc., Roseville, CA, USA). NaI solution (Dubrovsky *et al.*, 2009) cleared the root tips stained with propidium iodide (5 μg mL<sup>-1</sup>; MP) and Hoechst 33258 (2 μg mL<sup>-1</sup>; Sigma). These were then observed in a confocal laser scanning microscope (TCS SP2; Leica, Mannheim, Germany).

Segments of primary roots (length 1 cm) were fixed for 24 h in 2.5 % glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2), and then processed for scanning electron microscopy (JSM-6380LV; JEOL, Tokyo, Japan) as follows: dehydration through a gradual ethanol and acetone series, transfer to tertiary butanol, vacuum drying, followed by gold coating (Sputter Coater SCD 050, Bal-Tec).

### Analysis of developmental stages and quantification of primordia/LRs

The developmental stages of LR primordia were quantified from 1-cm-long root segments, using permanent longitudinal serial sections. The frequency of LR initiation was expressed as a LR initiation index  $I_{LR1} = 100 \times d \times l$ , where  $d$  is the density of LR initiation events (number  $\text{mm}^{-1}$ ) and  $l$  is the average fully elongated cortical cell length (mm) (Dubrovsky *et al.*, 2009).

### Quantification of lignin

Samples of selected root parts of plants grown for 16 and 130 d in a hydroponic system were dried at 60 °C and homogenized. The cell walls were purified (Selvendran, 1975) and incubated with thioglycolic acid (Bruce and West, 1989). The LTGAs (lignin thioglycolic acid derivates) were successively extracted from the cell walls and measured spectrophotometrically (Helios  $\alpha$ ; Unicam, Cambridge, UK) at 280 nm. The results were expressed as absorbance per dry weight of purified cell walls (Lange *et al.*, 1995).

### Statistical analyses

A two-sample *t*-test, and in the case of data without a normal distribution the Mann–Whitney/Wilcoxon or Kolmogorov–Smirnov non-parametric tests were applied (NCSS 2001; Jerry Hintze, Kaysville, UT, USA). For testing of differences in the proportion of particular developmental stages of primordium/LRs within the tested position of an entire root of wild-type and *lrt1* plants, Hotelling's two-sample *t*-test was used (Hotelling, 1931). The Bonferroni–Holm method was used to maintain the *P*-value for non-independent samples (Holm, 1979). Error bars within the plots indicate the standard errors (s.e.) of the mean.

## RESULTS

### The *lrt1* affects overall shoot and root sizes

Overall, mutant *lrt1* plants were more delicate than the wild-type phenotype, displaying fewer leaves, as well as shorter shoots and roots. Shoot and root elongation was affected according to the mode of cultivation as quantified for 16-d-old plants grown in moist paper, or alternatively, either in an aerated or non-aerated hydroponic culture (Table 1). The longest primary roots were obtained under aerated hydroponics. Wild-type primary roots, on average, were 40 % longer than the *lrt1* mutants under such conditions. Non-aerated hydroponics led to shorter primary roots; the wild-type were only 11 % longer than in the *lrt1*; those grown in moist paper sheets were 89 % longer than their *lrt1* siblings. In contrast, shoots grew best under non-aerated hydroponic conditions; they grew worst in moist paper. On average, wild-type shoots were between 43 and 57 % longer than the *lrt1* shoots at this stage of development.

### The *lrt1* affects root system architecture in an environmentally sensitive manner

LR formation was analysed in the 16-d-old plants under the cultivation conditions described above. Growth in moist paper

had the strongest inhibitory effect on the branching of both wild-type and mutant roots (Fig. 1A, D). While LRs were delayed, but still formed in the wild-type, no LRs were present in the *lrt1* mutant on primary or seminal roots (Fig. 1D). Both the aerated (Fig. 1B, E) and the non-aerated (Fig. 1C, F) hydroponic cultured plants formed frequent LRs on all root types of the wild-type (Fig. 1B, C), as well as the *lrt1* mutant (Fig. 1E, F) seedlings. Overall, the root systems from hydroponics were more complex than from paper cultivation, with the wild-type plants developing longer LRs, and more branched seminal roots. Mutant roots in non-aerated hydroponics (Fig. 1F) were brownish, with traces of decay.

A lower root system complexity, with less branching and very short LRs, was also observed for *lrt1* in long-term cultivation (Supplementary Data Fig. S1).

### The *lrt1* largely affects the latter stages of lateral root development

Bulges of lateral root primordia (LRP) were observed on the surface of *lrt1* primary roots 6 d after germination in both hydroponic cultivations, and about 2 d later in those germinated in moist paper. LR density was calculated for 16-d-old plants grown in hydroponics, and expressed as an LR initiation index (Fig. 2A, B). There was only a minor effect of *lrt1* on the frequency of LR initiation. LRP were initiated at comparable or even higher rates (in aerated hydroponics) in *lrt1* mutants (two-sample *t*-test,  $P < 0.01$ ,  $n = 8$ ).

The complete developmental process of LRP has been divided into five stages for simplified quantification (Fig. 2C). The first stage included the first anticlinal and periclinal divisions (maximum of two cell layers) in the pericycle. In the second stage, the LRP grew to half way through the cortex of the primary root. During the third stage, the LRP reached the peripheral layers of the primary root cortex. In the fourth stage, the LRs emerged from the maternal root. Finally, the last stage was reached when the LRs emerged from the primary root by more than 500  $\mu\text{m}$ . We tested fractions of particular developmental stages of primordium/LRs for specified root positions or for the entire root. In both cases, *lrt1*-related differences were detected ( $P < 0.05$ ; Hotelling's two-sample *t*-test,  $n = 8$ ). Defects in the development of later (post initiation) stages of LRP were pronounced in an increased proportion of the early (the second and the third) stages of LRP in *lrt1*. The early stages were present at a high frequency in *lrt1* primary roots, independent of the culture conditions, even in the basal portions among fully emerged LRs. This situation was not observed in the wild-type. Emergence of mutant LRs began significantly further away from the root tip in *lrt1* roots. In aerated hydroponics, the part of the primary root without emerged LRs was twice as long ( $1192.3 \pm 7.6$ ) as the wild-type ( $584.6 \pm 2.0$ ). In non-aerated hydroponics, it was extended by 76 % (*lrt1*:  $356.0 \pm 2.4$ , wild-type:  $202.1 \pm 4.6$ ); in moist paper it was extended by 36 % (*lrt1*:  $949.2 \pm 5.7$ , wild-type:  $697.3 \pm 10.0$ ) (two-sample *t*-test,  $P < 0.01$ ,  $n = 5-8$ , means  $\pm$  s.e.). A high percentage of *lrt1* LRPs do not emerge from the primary root (51 % fewer in the *lrt1* roots from non-aerated hydroponics, 69 % fewer in aerated hydroponics) (Fig. 2C).

TABLE 1. Shoot and root length (mm, mean  $\pm$  s.e.) of 16-d-old wild-type and *lrt1* seedlings under different cultivation conditions

	Moist paper ( <i>n</i> = 5)				Non-aerated hydroponics ( <i>n</i> = 8)				Aerated hydroponics ( <i>n</i> = 8)			
	Shoot		Root		Shoot		Root		Shoot		Root	
	WT	<i>lrt1</i>	WT	<i>lrt1</i>	WT	<i>lrt1</i>	WT	<i>lrt1</i>	WT	<i>lrt1</i>	WT	<i>lrt1</i>
	106.0 $\pm$ 2.62**	69.5 $\pm$ 2.7**	269.6 $\pm$ 10.9**	142.7 $\pm$ 4.2**	293.6 $\pm$ 13.9**	187.5 $\pm$ 6.3**	180.0 $\pm$ 3.1*	162.3 $\pm$ 7.0*	231.6 $\pm$ 3.7**	162.5 $\pm$ 2.8**	355.6 $\pm$ 9.9**	253.1 $\pm$ 6.1**

Asterisks indicate level of significance from two-sample *t*-test: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

#### Anatomy and growth of LRP are defective in *lrt1*

The structure of *lrt1* LRP was severely affected in hydroponics (Fig. 3; Supplementary Data Fig. S2). LRP of the early stages (S1–S3) were often noticeably wider and not well delimited (Fig. 3A) when comparing *lrt1* with the wild-type (Fig. 3D), often resulting in a mass of dividing cells of the pericycle, with a spatial arrangement deviating from standard LRP development (Supplementary Data Fig. S2). The surface layers of *lrt1* LRP of later stages often contained anomalously expanded and highly vacuolated cells (Fig. 3A, C). Anomalous volume growth and the loose arrangement of epidermal cells was far more obvious in the emerged LRs of *lrt1* (Fig. 3B, C, J, L). The typical structure of LRP, and later closed apical meristem structure with separated tiers of initials (and their derivatives), was lost in *lrt1* seedlings before emergence, or shortly thereafter (Fig. 3B, compare with wild-type in Fig. 3E; see also Supplementary Data Fig. S2). Development of the *lrt1* LRP was often associated with ectopic lignifications. Such an anomalous modification of the cell walls was often observed on the base of older LRP (Fig. 3C), as well as in the vicinity of fused and unconventionally spaced bulges of dividing cells, resembling LRP (Fig. 3F). Anomalous lignification was also detected in the pericycle of primary roots between protoxylem poles, where initiation of LRs normally takes place (Fig. 3G).

The progress of LR emergence in *lrt1* (Fig. 3H) was strongly affected compared with the wild-type (Fig. 3I). The tissues of the penetration site above the LRP did not separate normally, and emergence was probably impeded in *lrt1*. LRs that emerge from an *lrt1* primary root continue growth for a short period of time, and then terminate their growth very soon after emergence (usually no longer than 0.5 mm). The structure of the LR apical meristem is extremely disturbed (Fig. 3J, L); tiers of initials are not distinguishable as in the wild-type (Fig. 3K, M). Second-order LRP start to develop very close to the first-order LR tip in mutant root systems (Fig. 3J); however, this does not take place in the wild-type. The infrequently long LRs of *lrt1* (longer than 0.5 mm) are thicker, with randomly curved tips, as well as having anomalous arrangements and swelling of the epidermal cell layers.

#### The *lrt1* takes part in primary root development

The effect of the mutation was not as obvious in the primary root as it was in LRs. The roots of *lrt1* were thicker, primarily due to lateral expansion of the cortical cells (Supplementary Data Table S1).

Unlike in LRs, the closed arrangement of *lrt1* primary root apical meristems (Fig. 4A) apparently did not differ from the wild-type (Fig. 4B). However, the pattern of cell division seems to be affected up to some distance behind the promeristem, causing local irregularities in the radial and tangential arrangement of cortical cells (Fig. 4C). These are most evident in the outermost layers of the hypodermis and overlying epidermis, especially in the subapical and older parts of the primary roots (Fig. 4E, compared with the wild-type in 4D, F).





FIG. 1. Morphology of wild-type and *lrt1* root systems. Wild type (A–C) and mutant *lrt1* (D–F) plants grown under various growth conditions for 16 days. Compared with wild-type plants (A), no LR emergence was observed in *lrt1* plants (D) cultivated in moist paper. In contrast, LRP emerged in aerated hydroponics (wild-type, B; *lrt1*, E) and non-aerated hydroponics (wild-type, C; *lrt1*, F), respectively. In non-aerated hydroponics, mutants (F) displayed signs of decay, illustrated by brownish roots. The majority of LRs in *lrt1* mutants (E, F) terminated their growth during or shortly after emergence. Scale bars = 10 mm.

#### *The lrt1 affects the function of surface layers of the primary root*

The exodermis, suberized hypodermal layer with Berberin stainable Casparian strips, was only detected in those roots of plants cultivated between filter paper (Fig. 5A, B). An incorrect pattern of cell division within the subepidermal layers of *lrt1* mutants impaired the correct development of exodermal cell-wall modifications, and the proper positioning of the Casparian strips (Fig. 5A), which normally form a continuous cylinder (Fig. 5B). Frequently, cell-wall adhesion was reduced in the surface layers, causing partial separation of individual cells from layers predominantly observed in the older parts of mutant primary root (Fig. 5C, G). Irregularities in the arrangement of the exodermis modified the pattern of periodic acid penetration. This tracer penetrated sites of defective exodermis arrangement, and marked underlying cell layers of the

cortex. The sites where the probe did not pass across the exodermis (Fig. 5C) were similar to the continuous exodermis of wild-type seedlings (Fig. 5D). Prolonged exposure to periodic acid did not have any significant effect on the depth of tracer penetration, which stopped in sites of irregularities approximately in the third layer below the *lrt1* epidermis (data not shown). Ectopic lignification was detected in sites of exodermal irregularities in *lrt1* roots (Fig. 5G, compared with the wild-type in Fig. 5H). The absence of a developed exodermis from roots cultivated in hydroponics (Fig. 5E, F) allowed deep penetration of the periodic acid into wild-type roots (Fig. 5F). By contrast, in mutant roots under the same cultivation conditions, the probe did not penetrate into the root, only reaching the epidermis, and to sites where the irregular cell arrangement passed two layers deeper (Fig. 5E). The outermost cortical cell layers of *lrt1* were positive for lignin, but only in patches for

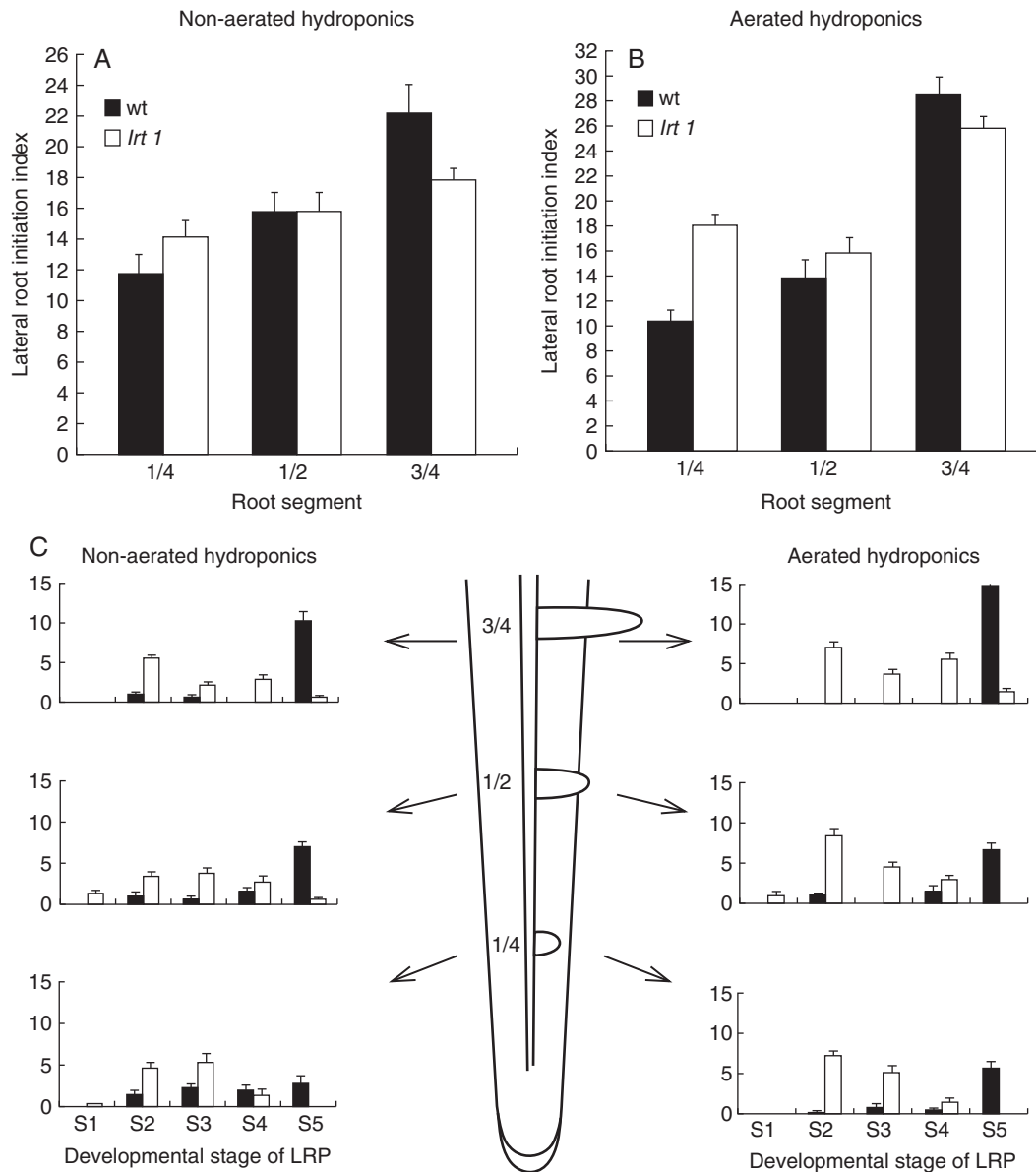


FIG. 2. Quantification of LRP initiation and LR growth (A, B) and analysis of developmental stages of LRP (C). Non-aerated hydroponics (A), aerated hydroponics (B). Mutants initiate comparable numbers of LRs as the wild-type, and in some cases the LR initiation index was even higher in aerated hydroponics (two-sample *t*-test,  $P < 0.01$ ). (C) Number of individual developmental stages of LRP (S1–S5 as specified in the text). Fraction of individual developmental stages of LRP changes along the root: from the first quarter of its length, the middle portion and the third quarter of the length from the tip of the primary root. A significantly lower percentage of LRP emergence (S4–S5) was observed in *lrt1* roots, regardless of the cultivation conditions. Proportions of the developmental stages along the root, as well as within the tested root position, were statistically different for *lrt1* and the wild-type. The differences were statistically significant (Hotelling's two-sample *t*-test,  $P < 0.05$ ). Values shown are mean numbers of individual developmental stages of LRP within the segment and s.e. ( $n = 8$ ).

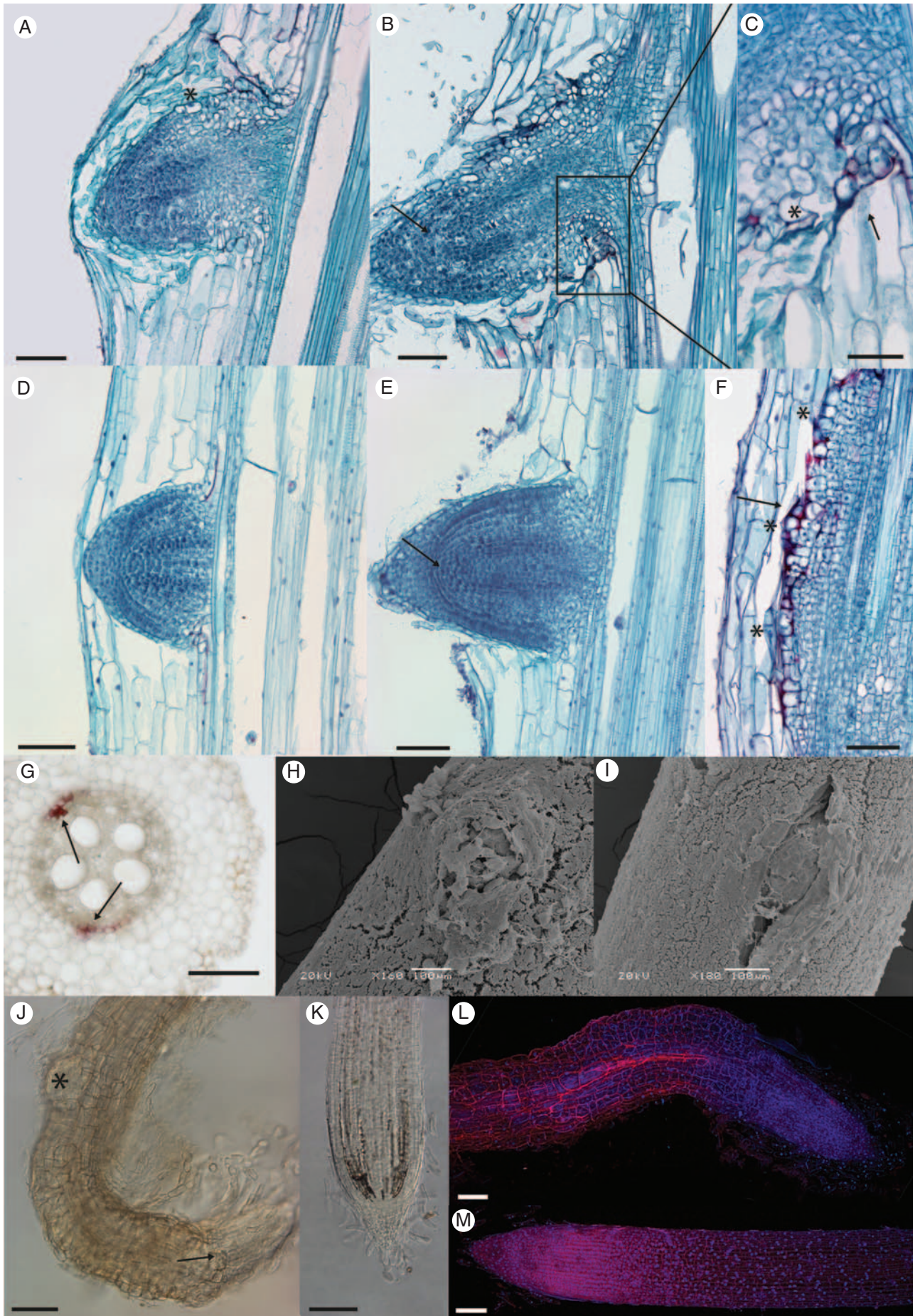
suberin; and no Berberin staining of Casparian strips was detected. Therefore, their pattern did not correspond to the arrangement of a typical exodermis; however, the permeability test strongly resembled the distribution of the probe in *lrt1* roots cultivated in moist paper (Fig. 5G).

#### Peroxidase activity and lignin content

Higher peroxidase activity was detected in the root tissues 1 cm from the tip (data not shown) and in the middle part of *lrt1* roots grown under any of the cultivation conditions. The

highest peroxidase activity was recorded with the paper cultivation (Fig. 5I–L). The strongest response was observed in the peripheral layers of the *lrt1* cortex (Fig. 5I), and in the pericycle between protoxylem poles (Fig. 5K) as comparing with the wild-type (Fig. 5J and L, respectively).

While induced lignification was frequently recorded in roots of *lrt1* plants, no significant quantitative changes in overall lignin content were detected (Supplementary Data Fig. S3). The cell walls of metaxylem vessels, pericycle and pith were significantly thicker in *lrt1* mutants (Supplementary Data Table S2). The mutant roots had a higher mechanical resistance



during sectioning, and displayed an increased resistance of the cortical tissues to pectinase and cellulase (data not shown).

## DISCUSSION

The root system of maize (*Zea mays*) contains several types of morphologically distinct roots (Hochholdinger and Tuberosa, 2009): embryonic roots – the primary root, and several seminal roots; as well as postembryonic nodal roots – underground crown roots and brace roots from shoot nodes (Feldman, 1994). LRs further extend the absorptive surface of the lower orders of roots. The maize mutant *lrt1* was described as not initiating LRs during early postembryonic development (6 d after germination), when grown in germination paper rolls soaked with distilled water (Hochholdinger and Feix, 1998). Partial recovery was reported with arbuscular mycorrhiza and/or high phosphate (Paszkowski and Boller, 2002). Previous proteomic studies had detected a set of proteins that were preferentially expressed in *lrt1* roots; a subset of these proteins is related to lignin metabolism (Hochholdinger et al., 2004a). The current study was initiated to understand more about the role of *lrt1* in root development and growth. Because the effects of environmental conditions had been recorded previously, different cultivation systems and long-term cultivations were involved to allow for better generalization of the results.

The frequency of initiation events was quantified in later plant development to further characterize the *lrt1* effect. Bulges of LRP appeared on the surface of primary and seminal roots of 6-d-old *lrt1* seedlings under hydroponics, appearing 2 days later in those grown on moist paper. However, bulges of LRP did not typically emerge out of the primary root, suggesting a substantial role of *lrt1* in the later development of LRs. Quantitative analysis of initiation indicated that the primary target of *lrt1* is not initiation per se, as originally suggested. The density of initiation was normalized to different cortex cell length in *lrt1* mutants, and expressed as an LR initiation index (Dubrovsky et al., 2009). In fact, the total number of initiated LRP within the primary root was not significantly different from the wild-type in stagnant hydroponics, and was even slightly higher in aerated hydroponics. The difference between the current and original observations of the lack of LRP in early postembryonic development (Hochholdinger and Feix, 1998) should be related to the effects of cultivation conditions (e.g. different types of cultivation paper; different nutrient solution), as well as the ages

of the sampled roots. Due to the augmented sensitivity of *lrt1* plants to environmental conditions, initiation was delayed and sampling for anatomical sections at 4 d did not reveal the presence of LRP. Older plantlets from the original experiment (figure 1c, d in Hochholdinger and Feix, 1998) were grown for 2 weeks in paper rolls before being transferred to hydroponics. Anatomical analyses were not performed on older roots (Hochholdinger and Feix, 1998) and the data presented thus expand on previous findings.

Initiation of LRs in maize takes place in pericycle sectors, opposite to the phloem, at some distance from the apical meristem (Bell and McCully, 1970). The process, which is similar to that in other plants such as *A. thaliana*, contains the determination of founder cells (De Smet, 2012), subsequent divisions and emergence of LRs from the primary root (Smith and De Smet, 2012). Defects related to *lrt1* in the early stages of LRP included the formation of groups of dividing cells in the pericycle. This might be related to incorrect spatial regulation of the initiation events (Laskowski et al., 1995; Sreevidya et al., 2010), and/or the spatial definition of groups of dividing cells of LRP within the pericycle (Shuai et al., 2002).

A highly regular pattern of cell division is a typical feature of LRP development in many model plants (De Smet et al., 2006) such as: *A. thaliana* (Malamy and Benfey, 1997), *Raphanus sativus* (Szymanowska-Pulka and Nakielski, 2010), *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* and *Z. mays* (Bell and McCully, 1970; MacLeod and Thompson, 1979). In maize, a set of unequal and equal divisions creates distinct LR populations of precursors present for stele, cortex with root epidermis, and root cap. Such a pattern is disturbed in *lrt1* mutants, appearing more obvious in the later developmental stages. The means of differentiation of the primary root epidermis should also affect emergence of LRs. Penetration of the LRs through the overlying tissues is facilitated by local auxin maxima inducing the expression of cell-wall-remodelling enzymes, leading to cell-wall adhesion in *A. thaliana* (Péret et al., 2009). The typical separation of cell walls in the vicinity of the emerging LRs, and facilitating their emergence, is observed in the wild-type but not in *lrt1* roots. Apparently, LRP of *lrt1* come through 'unprepared' layers of parental root tissues that do not easily open, and are stretched during LRP outgrowth. Moreover, lignification detected in the surface layers of primary roots may play an important role, causing difficulties during penetration of LRP, as described in *O. sativa* (Justin and Armstrong, 1991). However,

FIG. 3. Changes in anatomy and emergence of *lrt1* LRP. Plants were cultivated for 16 d in non-aerated hydroponics. LRP of the *lrt1* mutant display an altered structure before (A) and after (B) emergence compared with the wild-type (D, E). Anomalous highly vacuolated cells were observed on the surface and on the base of *lrt1* LRP (A, C, asterisks). A loose arrangement of epidermal cells was obvious in the emerged *lrt1* LRs (B). The structure of root apical meristem of LRP, and later in the apex of LRs with separation of root cap and tiers of initials and their derivatives is lost in *lrt1* (B, arrow) compared with the wild-type (E, arrow). Lignifications (red) were often detected in *lrt1* on the base of emerged LRP (C, arrow), around the malformed LRP (F, arrow; asterisks mark individual LRP), and in the pericycle of the primary root where initiation normally takes place (G, arrows). Emergence of LRs in *lrt1* (H) and separation of the surface cell layers is modified; see (I) for the wild-type. The *lrt1* mutant (J) shows irregular divisions in the surface area of LR tips and disorganization in the root apical meristem (J, arrow). Second-order LRP develop very close to first-order LR tips in *lrt1* (J, asterisk), which often show strong curvature. Arrangement and anomalous cell volume growth is obvious in the epidermis of LRs (J, L, for *lrt1*; K, M, for the wild-type). (A–F) Longitudinal permanent sections stained with Safranin and Fast Green. The sections were prepared from the first quarter of the length from the tip of the primary root. (G) Free-hand section from the middle of the primary root, HCl-phloroglucinol. (H, I) Scanning electron micrographs showing samples from the first quarter from the tip of the primary root. (J–M) Roots were cleared with NaI and stained with propidium iodide and Hoechst 33258. (J, K) Differential interference contrast microscopy; (L, M) confocal laser scanning microscopy, maximal projection. Scale bars = 100  $\mu$ m, except (C) = 50  $\mu$ m.

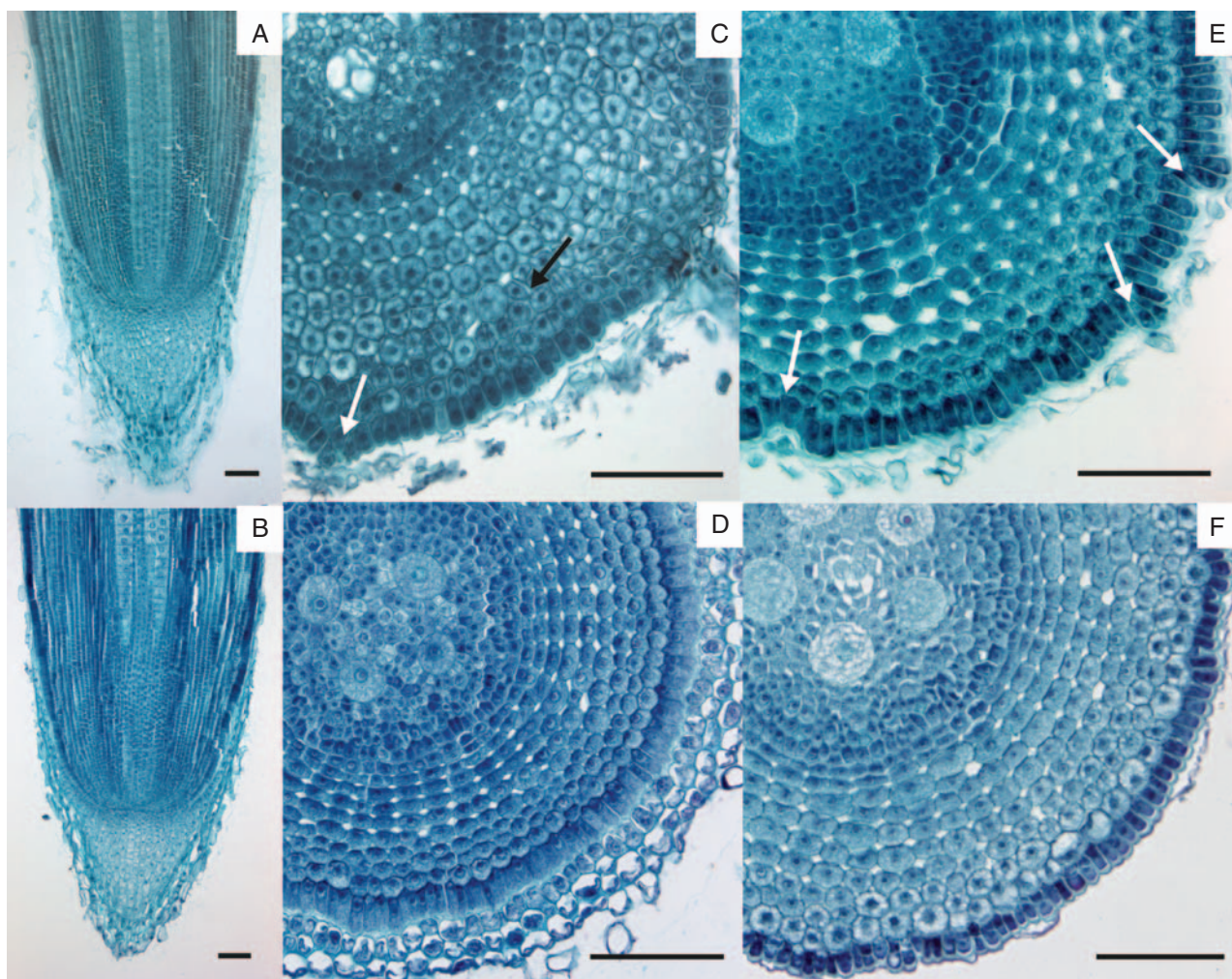


FIG. 4. Root apical meristem structure and irregularities in epidermal/cortical cell divisions behind the apex in primary roots of *lrt1*. The mutant shows normal arrangement of the closed primary root apical meristem (A) similar to the wild-type (B). In some places, the mutant displays disruption of the regular radial and tangential organization of the cortex (C, black arrow) and epidermis (C, white arrow). White arrows in C and E point to particular sites of disturbances at different distances from the meristem in *lrt1* (C: approx. 300  $\mu\text{m}$ , E: approx. 700  $\mu\text{m}$ ). None of these differences was found in the wild-type (D: approx. 300  $\mu\text{m}$ , F: approx. 800  $\mu\text{m}$ ). Aerated hydroponics, permanent serial sections from four root tips 1 cm long were stained with Safranin and Fast Green. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ , except (C) = 150  $\mu\text{m}$ .

the biomechanical effect of modified epidermal and hypodermal development can hardly explain the changes of LRP structure before emergence, or of LR apical meristems after emergence (Potocka *et al.*, 2011). The premature loss of apical meristem activity of LRs should therefore (at least partially) be related to failure mechanisms of apical meristem maintenance. The loss of LR apical meristems was described earlier in maize as a common developmental event of some LRs in older parts of the primary root (Varney and McCully, 1991). Additionally, under unfavourable conditions, the root apical meristem can be reorganized, and its activity modified through redox-mediated signalling (De Tullio *et al.*, 2010). Such an association seems to be attractive for *lrt1*, which is more sensitive to the environmental conditions. We can speculate that higher peroxidase activity (or other reactive oxygen species-related metabolism) in the tissues could further accelerate the onset of meristem activity termination of LRs. Impaired specification of cell lineages and the coordination

of tissue development is particularly obvious on precursors of the epidermis in LRP, with anomalous vacuolization and volume growth, which becomes far more distinct after emergence of the LRs (when epidermal cells with abnormal volume growth are particularly conspicuous).

Only a low percentage of LRs emerge in *lrt1*, and exceed a length of more than 0.5 mm. The emerged *lrt1* LRs are shorter, curved and thicker, and the structure of their apex is intensely affected. Loss of the root apical meristem probably eliminates the inhibitory effect, and the formation of secondary LRs very close to the root tip is frequently observed.

The development of primary roots is also affected with mutation; noticeable changes in their length and radial growth were recorded. Contrary to LRs, where the apical meristem structure, as well as its function are severely affected; no significant defects in the longitudinal arrangement and maintenance of the apical meristem were observed in the primary roots, pointing to different regulatory mechanisms and/or

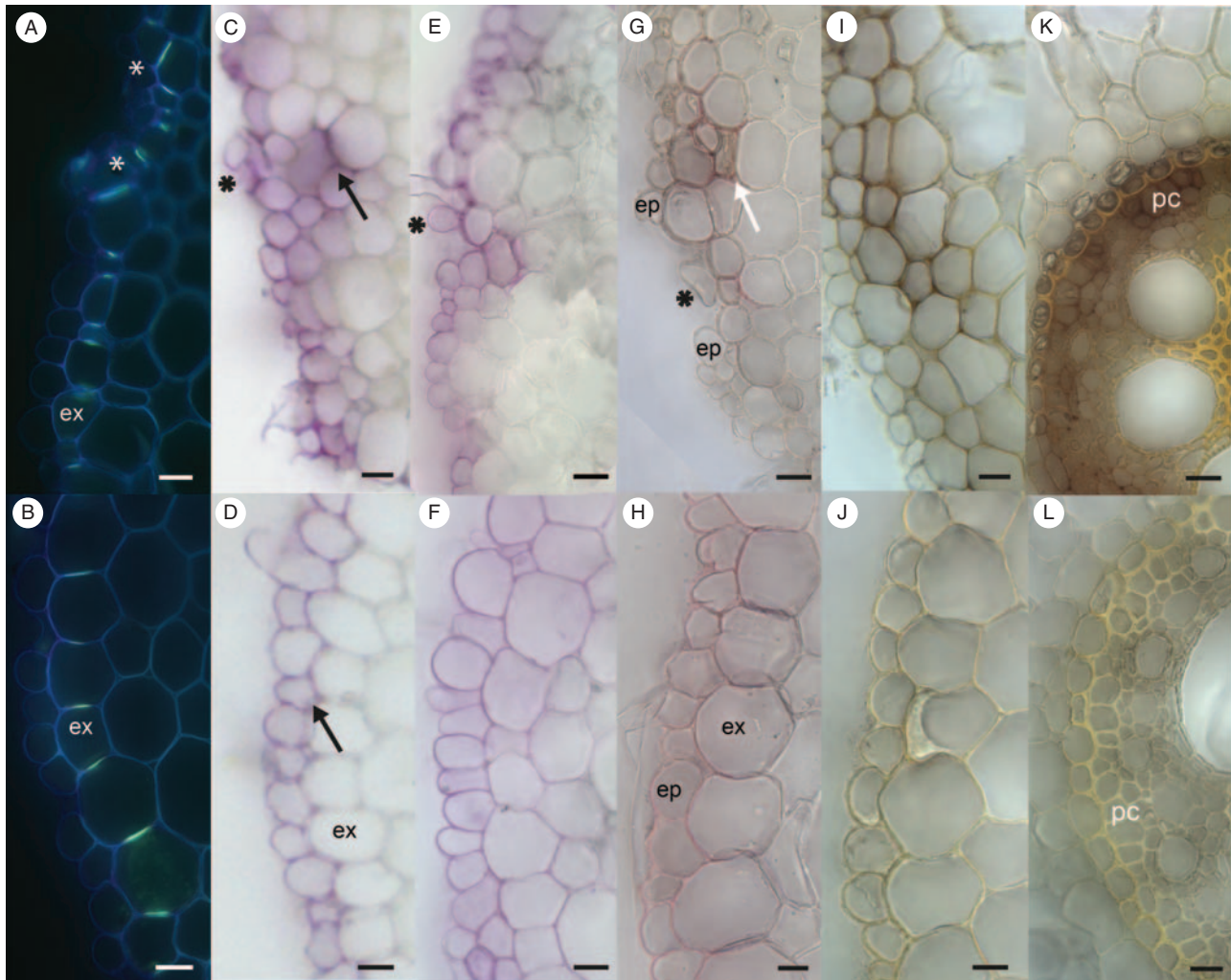


FIG. 5. Details of primary root surface layers of 16-d-old wild-type and *lrt1* plants. (A, B) Exodermis (ex) only developed by cultivation in paper. Arrangement of Casparian strips is modified in *lrt1* (A, asterisk) in comparison with the wild-type (B), where Casparian strips form a continuous cylinder. Berberine hemisulfate with Crystal Violet, UV. (C–F) The permeability test of the root surface with periodic acid detected changes in exodermis function in *lrt1*. Pink colour indicates tissues penetrated with the probe. The plants were cultivated in paper (C, D) and in non-aerated hydroponics (E, F), where the roots created no exodermis. The *lrt1* mutant shows the same pattern of penetration under both cultivation conditions (C, E). In all cases, periodic acid did not penetrate beyond the epidermis, but in sites of irregularities moved approximately into the third layer from the surface (black arrow). In wild-type primary roots, the probe only penetrated into the epidermis in paper-cultivated roots (D, black arrow), while in non-aerated hydroponics it penetrated into the whole cortex (F). (G, H) Lignin detection with HCl-phloroglucinol in paper-cultivated roots. In *lrt1* roots (G) lignin was deposited in the peripheral layers of the primary root, mainly in sites of irregular cell arrangement (white arrow; ep, epidermis), similar to the penetration of periodic acid. In wild-type primary roots, lignin was detected in the exodermis (ex) (H). Cell-wall adhesion is weakened in the surface layers of *lrt1*, causing a release of individual cells from the layers (C, E, G, asterisks). (I–L) Detection of peroxidase activity in paper-cultivated plants. Strong activity of peroxidase was detected in all tissues of *lrt1* roots (I, K). The maximum activity was observed in surface layers of the cortex (I), and in the central cylinder, mainly in the pericycle (pc) (K). Very low activity was observed in wild-type primary roots (J, L). All sections were cut in the middle of the primary root. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ .

responses. Such differences in regulatory mechanisms for different types of roots were reported earlier for other maize mutant lines (Hochholdinger *et al.*, 2004b; Inukai *et al.*, 2005). Irregularities connected to an altered manner of differentiation and/or aberrant cell divisions in the basal part (some distance from the promeristem) of ground meristem and protoderm were evident in differentiated parts of *lrt1* primary roots. The higher variation of cell sizes indicates some impaired coordination of development, partial loss of cell adhesion and continuity of layers, all of which results in disruption of the root surface. These disturbances could be connected to ectopically induced lignification; however, it is difficult here to

separate cause and consequence. Plant extracellular peroxidases play important roles during the plant's entire development (Hiraga *et al.*, 2001); however, they are also induced during plant injury and defence responses, and they play a key role in several metabolic processes, for example auxin metabolism, lignin and suberin formation, cross-linking of cell-wall components, and the metabolism of reactive oxygen species (Almagro *et al.*, 2009; Burr and Fry, 2009). Peroxidases use  $\text{H}_2\text{O}_2$  for oxidation and connection of cell-wall compounds such as tyrosine residues, monolignols, suberin units and ferulic acids, resulting in the creation of a rigid network (Passardi *et al.*, 2004). The higher activity of

peroxidases in *lrt1* might be connected to the higher (and possibly premature) rigidity of the cell walls of developing tissues. It might be related to the thicker cell walls of *lrt1*, together with the higher mechanical resistance of tissues, increased resistance of cortical tissues to pectinase and cellulase, and disrupted coordination of volume changes during growth of the outer cell layers. In this case, further work would also be necessary to distinguish whether the higher abundance of peroxidase and the mentioned cell-wall modifications are the mechanisms creating the damage, or whether it is a consequence/response to higher stress (suboptimal conditions) in the tissue.

In maize, under certain environmental conditions, the hypodermal layers differentiate (in our study under paper cultivation) into exodermis – morphologically distinct cell layers with Casparian strips and suberin lamellae (Enstone and Peterson, 2005; Zimmermann *et al.*, 2000), which modulates the permeability of the root surface, and accordingly also in their interactions with the surrounding rhizosphere (Hose *et al.*, 2001). Both the proper spatial arrangement and coordination of exodermal cell development are required for the correct set-up of a continual cylinder of Casparian strips, as well as its later functioning. A similar phenomenon was described in the endodermis of *A. thaliana* (Martinka *et al.*, 2012). In *lrt1* roots, the improperly coordinated divisions lead to the loss of continuity of the exodermal cell layer, and a disturbance in the positioning of Casparian strips. The effect of lost barrier continuity was documented by penetration of an apoplastic tracer (periodic acid), which locally passed across the exodermis of *lrt1* but not the wild-type. The penetration depth of the apoplastic tracer in *lrt1* was restricted to layers beneath due to ectopic lignification, suberization and other cell-wall modifications. The presence of an apoplastic barrier was also detected in *lrt1* roots under conditions non-inducible for the exodermis in the wild-type. Penetration, in this case, was limited to the outermost cortical layers; in the wild-type, without exodermis grown under the same cultivation conditions, the apoplastic tracer passed up to the endodermis. The character of this barrier in *lrt1* does not fit the standard exodermis. Cell-wall modifications resemble those induced by injury, which include *inter alia* ectopic deposition of lignin and patchy suberization reducing apoplastic permeability of non-exodermal layers.

Higher levels of the enzymes of lignin biosynthesis and the metabolism of phenolics detected in proteomic studies of *lrt1* roots (Hochholdinger *et al.*, 2004a) might be related to such ‘injury-related’ responses, as well as to the abnormal lignification in the pericycle or outer cortex. Such protection/defence reactions are in accordance with the higher sensitivity of *lrt1* to environmental conditions, and possibly its lower ability to control the internal environment. To confirm whether lignin biosynthesis is related to local stress or injury responses, or if it represents a global metabolic change in *lrt1* plants, we have quantified the lignin content in different plant organs. No significant increase was detected in *lrt1*, indicating that a global increase of lignin metabolism is not an effect of *lrt1*. Most probably, it is a correction mechanisms responding to the internal tissue imbalance in the coordination of both development and differentiation.

Based on the results of this study, the *lrt1* gene takes part in the control of LRP development and emergence, and also

disturbs the ability of plants to maintain the activity of LR apical meristems. Furthermore, the mutant indicates a difference of root apical meristem development and maintenance mechanisms within the primary roots and LRs. Hence, *lrt1* provides a unique link between LR formation, root apical meristem maintenance and their environment. Identification of the *lrt1* gene sequence will provide further insights into LR initiation and regulation of development in monocot plants.

#### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at [www.aob.oxfordjournals.org](http://www.aob.oxfordjournals.org) and consist of the following. Figure S1: root system and inflorescences of plants grown for 130 d and detail of the second youngest leaves from 16-d-old plants. Figure S2: additional photographs of affected structure of *lrt1* LRP. Figure S3: quantification of lignin using thioglycolic acid, followed by alkaline hydrolysis in adult plants from long-term hydroponic cultivation. Table S1: number of cortex layers, diameter of primary cortex and central cylinder in the middle of the primary root of 16-d-old wild-type and *lrt1* plants, under different cultivation conditions. Table S2: thickness of cell walls of metaxylem vessels, pericycle and pith.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to acknowledge the help of Dr A. Černíková (Inst. Applied Mathematics and IT, Faculty of Science, Charles University in Prague) with the statistical evaluation of our data. Financial support was provided by projects MŠMT LC06034, COST 49-208081 and GAUK 43-251346.

#### LITERATURE CITED

- Almagro L, Ros LVG, Belchi-Navarro S, Bru R, Barceló AR, Pedreño MA. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* **60**: 377–390.
- Arnon DI. 1938. Microelements in culture-solution experiments with higher plants. *American Journal of Botany* **25**: 322–325.
- Bell D, McCully ME. 1970. A histological study of lateral root initiation in *Zea mays*. *Protoplasma* **70**: 179–205.
- Bruce RJ, West CA. 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology* **91**: 889–897.
- Brundrett MC, Enstone DE, Peterson CA. 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin and callose in plant tissue. *Protoplasma* **146**: 133–142.
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7B or Fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-clycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111–116.
- Burr SJ, Fry SC. 2009. Feruloylated arabinoxylans are oxidatively cross-linked by extracellular maize peroxidase but not by horseradish peroxidase. *Molecular Plant* **2**: 883–892.
- Chhun T, Taketa S, Tsurumi S, Ichii M. 2003a. Interaction between two auxin-resistant mutants and their effects on lateral root formation in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **54**: 2701–2708.
- Chhun T, Taketa S, Tsurumi S, Ichii M. 2003b. The effects of auxin on lateral root initiation and root gravitropism in a lateral rootless mutant *Lrt1* of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* **39**: 161–170.
- Clowes FAL. 1978. Chimeras and the origin of lateral root primordia in *Zea mays*. *Annals of Botany* **42**: 801–807.
- De Smet I. 2012. Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytologist* **193**: 867–873.

- De Smet I, Vanneste S, Inze D, Beeckman T. 2006. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology* **60**: 871–887.
- De Tullio MC, Jiang K, Feldman LJ. 2010. Redox regulation of root apical meristem organization: connecting root development to its environment. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 328–336.
- Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucially-Mendivil S, Jeknić Z, Ivanchenko MG. 2009. The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* **103**: 807–817.
- Enstone DE, Peterson CA. 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, Cell and Environment* **28**: 444–455.
- Esau K. 1965. *Anatomy of seed plants*. New York: Wiley.
- Feldman L. 1994. The maize root. In: Freeling M, Walbot V. eds. *The maize handbook*. New York: Springer, 29–33.
- Hao Z, Masahiko I. 1999. A mutant *RM109* of rice (*Oryza sativa* L.) exhibiting altered lateral root initiation and gravitropism. *Japanese Journal of Crop Science* **68**: 245–252.
- Hiraga S, Sasaki K, Hiroyuki I, Ohashi Y, Matsui H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* **42**: 462–468.
- Hoagland DR, Amon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular 347 of University of California, Agricultural Experimental Station Berkeley*.
- Hochholdinger F, Feix G. 1998. Early post-embryonic root formation is specifically affected in the maize mutant *lrl1*. *The Plant Journal* **16**: 247–255.
- Hochholdinger F, Tuberosa R. 2009. Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 172–177.
- Hochholdinger F, Park WJ, Feix GH. 2001. Cooperative action of *SLR1* and *SLR2* is required for lateral root-specific cell elongation in maize. *Plant Physiology* **125**: 1529–1539.
- Hochholdinger F, Guo L, Schnable PS. 2004a. Lateral roots affect the proteome of the primary root of maize (*Zea mays* L.). *Plant Molecular Biology* **56**: 397–412.
- Hochholdinger F, Woll K, Sauer M, Dembinsky D. 2004b. Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Annals of Botany* **93**: 359–368.
- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* **6**: 65–70.
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W. 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2245–2264.
- Hotelling H. 1931. The generalization of Student's ratio. *Annals of Mathematical Statistics* **2**: 360–378.
- Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, et al. 2005. *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signalling. *The Plant Cell* **17**: 1387–1396.
- Jansen L, Roberts I, De Rycke R, Beeckman T. 2012. Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1525–1533.
- Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry – principles and practice*. San Francisco: Freeman.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Justin SHFW, Armstrong W. 1991. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* **118**: 49–62.
- Kapulnik Y, Delaus PM, Resnick N, et al. 2011. Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* **233**: 209–216.
- Lange BM, Lapierre C, Sandermann H. 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignings. *Plant Physiology* **108**: 1277–1287.
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum H, Sussex IM. 1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**: 3303–3310.
- Lavy M, Prigge MJ, Tigyi K, Estelle M. 2012. The cyclophilin DIAGEOTROPICA has a conserved role in auxin signaling. *Development* **139**: 1115–1124.
- Lenochová Z, Soukup A, Votrubová O. 2009. Aerenchyma formation in maize roots. *Biologia Plantarum* **53**: 263–270.
- MacLeod RD, Thompson A. 1979. Development of lateral root primordia in *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*: rates of primordium formation and cell doubling times. *Annals of Botany* **44**: 435–449.
- Majer Ch, Hochholdinger F. 2011. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends in Plant Science* **16**: 47–52.
- Malamy JE. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment* **28**: 67–77.
- Malamy JE, Benfey PN. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44.
- Martinka M, Dolan L, Pernas M, Abe J, Lux A. 2012. Endodermal cell–cell contact is required for the spatial control of Casparian band development in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **110**: 361–371.
- Muday GK, Lomax TL, Rayle DL. 1995. Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, *diageotropica*. *Planta* **195**: 548–553.
- Park WJ, Hochholdinger F, Gierl A. 2004. Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral- and crown root emergence in *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* **161**: 981–985.
- Passardi F, Penel C, Dunand Ch. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**: 534–540.
- Paszkowski U, Boller T. 2002. The growth defect of *lrl1*, a maize mutant lacking lateral roots, can be complemented by symbiotic fungi or high phosphate nutrition. *Planta* **214**: 584–590.
- Pearse AG. 1968. *Histochemistry (theoretical and applied)*. London: J. and A. Churchill.
- Péret B, Larrieu A, Bennett MJ. 2009. Lateral root emergence: a difficult birth. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3637–3643.
- Potocka I, Szymanowska-Pulka J, Karczewski J, Nakielski J. 2011. Effect of mechanical stress on *Zea* root apex. I. Mechanical stress leads to the switch from closed to open meristem organization. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4583–4593.
- Schlicht M, Strnad M, Scanlon MJ, et al. 2006. Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Signaling and Behavior* **1**: 122–133.
- Selvendran RR. 1975. Analysis of cell wall material from plant tissues: extraction and purification. *Phytochemistry* **14**: 1011–1017.
- Shuai B, Reynaga-Peña CG, Springer PS. 2002. The *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiology* **129**: 747–761.
- Smith S, De Smet I. 2012. Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1441–1452.
- Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubová O. 2007. Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist* **173**: 264–278.
- Sreevidya VS, Hernandez-Oane RJ, Gyaneshwar P, Lara-Flores M. 2010. Changes in auxin distribution patterns during lateral root development in rice. *Plant Science* **178**: 531–538.
- Szymanowska-Pulka J, Nakielski J. 2010. The tensor-based model for growth and cell divisions of the root apex. II. Lateral root formation. *Planta* **232**: 1207–1218.
- Tung P, Hooker TS, Tampe PA, Reid DM, Thorpe TA. 1996. Jasmonic acid: effects on growth and development of isolated tomato roots cultured *in vitro*. *International Journal of Plant Sciences* **157**: 713–721.
- Varney GT, McCully ME. 1991. The branch roots of *Zea*. II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New Phytologist* **118**: 535–546.
- Wang H, Taketa S, Miyao A, Hirochika H, Ichii M. 2006. Isolation of a novel lateral-rootless mutant in rice (*Oryza sativa* L.) with reduced sensitivity to auxin. *Plant Science* **170**: 70–77.
- Woll K, Borsuk LA, Stransky H, Nettleton D, Schnable PS, Hochholdinger F. 2005. Isolation, characterization, and pericycle-specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant *rum1*. *Plant Physiology* **139**: 1255–1267.
- Zimmermann HM, 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 R, Sakai H, Hochholdinger F. 2010. The *gibberelic acid stimulated-like* gene family in maize and its role in lateral root development. *Plant Physiology* **152**: 356–365.



## SUPPLEMENTARY DATA

FIG. S1. Root system (A–C) and inflorescences (D–G) of plants grown for 130 d and detail of the second youngest leaves from 16-d-old plants (H–J). Compared to the wild type (A), the *lrt1* root system (B) is less complex. Formation of crown root primordia from shoot-nodes in hydroponic cultivation was delayed and reduced by ~20% in *lrt1* ( $n = 6$ ). Roots of *lrt1* were very fragile, with brownish zones frequently having decayed root tips (C, asterisks); seldom-formed LR roots were short and many were severely curved. Scale bars = 400  $\mu$ m. The homozygous *lrt1* plants were more susceptible to adverse environmental influences. In long-term hydroponics without sufficient aeration, plants were very susceptible to fungal attack of their root system, and were unable to survive deeper hypoxia of stagnant Hoagland solution supplied with 0.05% agar more than a few days (data not shown). Homozygous *lrt1* plants formed sterile inflorescences even in field conditions: (D, F) for the wild type, (E, G) for *lrt1*. In comparison with the wild type (H), mutant plants exhibited symptoms of nutrient deficiencies (I). Interestingly, such behaviour was even induced in plants of normal genotype grown in the same container with *lrt1* plants (J).



FIG. S2. Additional photographs of affected structure of *lrt1* LRP. Plants were cultivated for 16 d in aerated hydroponics. Mutant plants often developed groups of LRPs very close together (A, asterisks mark individual LRP) and with anomalously expanded cells (B, asterisks; arrow marks lignification). Fully-emerged mutant LR (C, asterisk marks LRP, arrows mark lignification), compared with the typical close root apical meristem structure in LR of the wild type (D). LRP before (E) and after (F) emergence. Scale bars = 100  $\mu$ m.

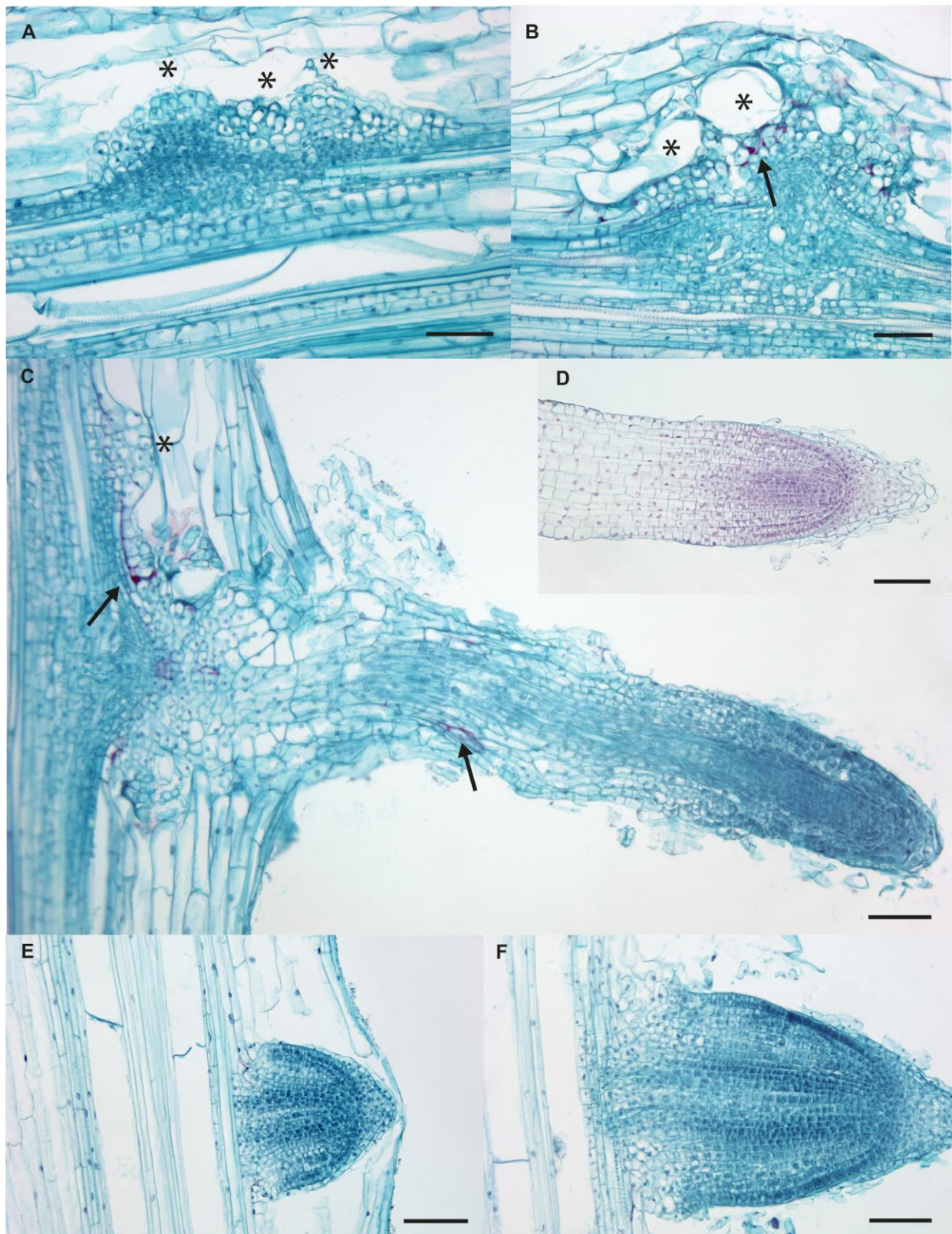


FIG. S3. Quantification of lignin using thioglycolic acid, followed by alkaline hydrolysis in adult plants from long-term hydroponic cultivation. Results are expressed as absorbance per dry weight of purified cell walls ( $\text{g}^{-1}$ ). Older fully-differentiated parts of plants were sampled. Leaves, nodes, and internodes from the basal first quarter of the shoot length; adventitious nodal roots (ANR) were sampled from the first node above water level. LRs under the water level were divided into two groups - first order LRs (LR I.) and higher orders LRs (other LR). No significant differences were identified between *lrt1* and the wild type. Two-sample *t*-test, mean values  $\pm$  s.e.,  $n = 4$ .

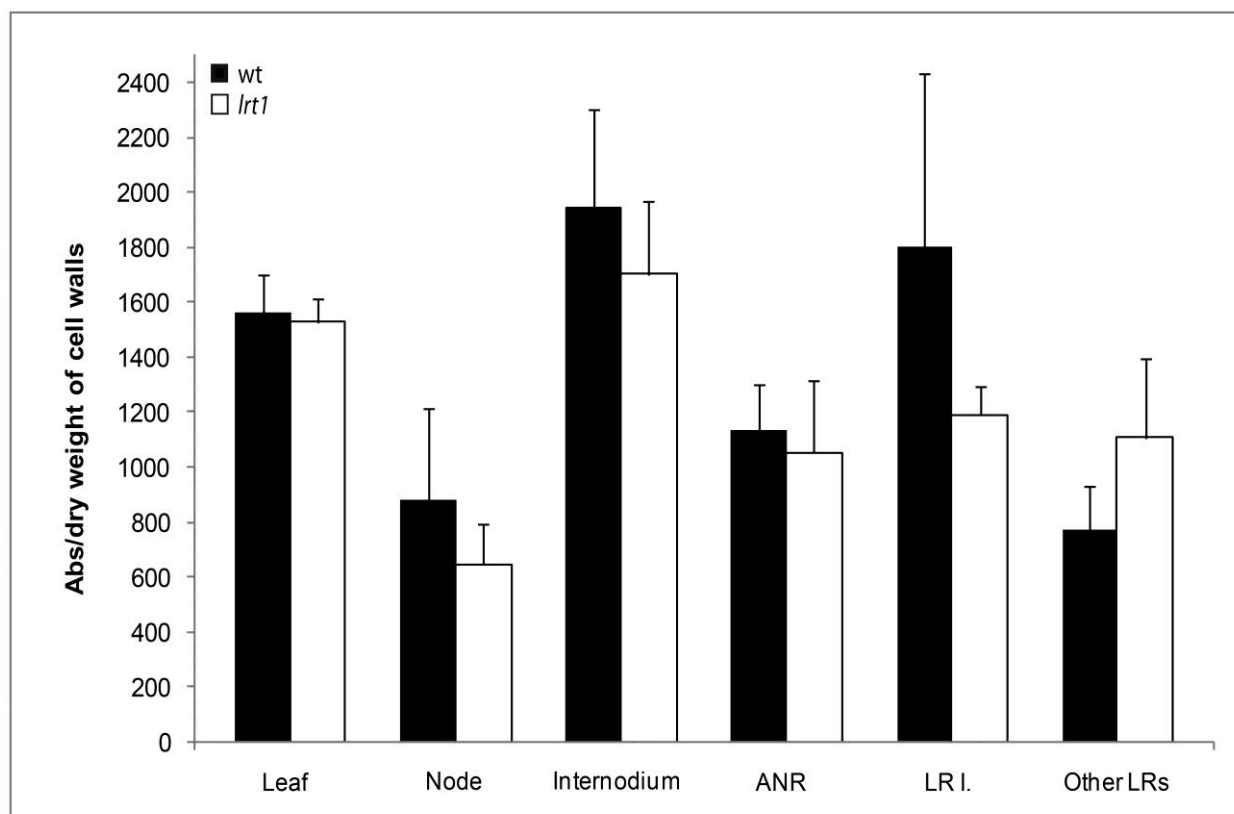


TABLE S1. Number of cortex layers, diameter of primary cortex and central cylinder (in mm  $\pm$  s.e.) in the middle of the primary root of 16-d-old wild type and *lrt1*, under different cultivation conditions

		Number of cortex layers		Diameter of primary cortex		Diameter of central cylinder	
<b>Moist paper</b>	<b>wt</b>	6.3 $\pm$ 0.1	-	98.8 $\pm$ 1.8	*	160.0 $\pm$ 1.9	-
	<b><i>lrt1</i></b>	6.6 $\pm$ 0.2	-	106.4 $\pm$ 3.1	*	161.9 $\pm$ 1.9	-
<b>Non-aerated hydroponics</b>	<b>wt</b>	7.0 $\pm$ 0.1	-	99.8 $\pm$ 1.6	*	170.3 $\pm$ 2.1	-
	<b><i>lrt1</i></b>	7.0 $\pm$ 0.2	-	111.3 $\pm$ 3.9	*	172.0 $\pm$ 1.7	-
<b>Aerated hydroponics</b>	<b>wt</b>	5.8 $\pm$ 0.8	*	76.4 $\pm$ 1.3	**	161.6 $\pm$ 2.1	**
	<b><i>lrt1</i></b>	6.3 $\pm$ 0.5	*	114.9 $\pm$ 1.6	**	177.6 $\pm$ 1.8	**

two-sample t-test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;  $n = 5$  (3 sections and 3 measurements per 1 root)

TABLE S2. Thickness of cell walls of metaxylem vessels, pericycle and pith (in mm  $\pm$  s.s.). Samples were taken from a first- and third-quarter of primary root length of 16-d-old wild type and *lrt1* seedlings in hydroponics. Cell walls of metaxylem vessels, pericycle and pith were significantly thicker in *lrt1* roots, compared to the wild type. Thickness was measured on permanent sections. Three sections, with three measurements on every section, in every area

			Metaxylem vessels		Pericycle		Pith	
<b>Non-aerated hydroponics<sup>x</sup></b>	$\frac{1}{4}$	<b>wt</b>	0.82 $\pm$ 0.04	**	1.09 $\pm$ 0.04	**	0.81 $\pm$ 0.01	**
		<b><i>lrt1</i></b>	1.42 $\pm$ 0.06	**	1.50 $\pm$ 0.06	**	1.67 $\pm$ 0.18	**
	$\frac{3}{4}$	<b>wt</b>	1.66 $\pm$ 0.09	**	1.45 $\pm$ 0.05	-	1.08 $\pm$ 0.22	-
		<b><i>lrt1</i></b>	2.73 $\pm$ 0.09	**	1.52 $\pm$ 0.06	-	1.31 $\pm$ 0.23	-
<b>Aerated hydroponics<sup>y</sup></b>	$\frac{1}{4}$	<b>wt</b>	1.26 $\pm$ 0.05	**	1.25 $\pm$ 0.05	**	1.83 $\pm$ 0.07	**
		<b><i>lrt1</i></b>	3.28 $\pm$ 0.11	**	2.07 $\pm$ 0.08	**	2.71 $\pm$ 0.17	**
	$\frac{3}{4}$	<b>wt</b>	2.85 $\pm$ 0.07	**	1.35 $\pm$ 0.05	**	1.46 $\pm$ 0.25	*
		<b><i>lrt1</i></b>	4.26 $\pm$ 0.09	**	2.04 $\pm$ 0.07	**	2.11 $\pm$ 0.16	*

two-sample t-test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

<sup>x</sup>  $n = 6$ , <sup>y</sup>  $n = 8$

### 3.2 Studium variability struktury a funkce apoplastických bariér v rámci celého kořenového systému kukuřice (*Zea mays*) za různých podmínek prostředí

Tato studie poskytuje výsledky získané z kultivačních podmínek s vybranými stresory působícími na rostliny, jakými jsou nízký vodní potenciál, salinita, těžké kovy, organické kyseliny, popř. nedostatek kyslíku. Výsledky ukazují výrazný vliv různých podmínek prostředí na celou architekturu kořenového systému a zastoupení jednotlivých typů kořenů.

Při sledování vývoje endodermis v kořenech různé délky, věku a řádu jsme nepozorovali významné změny v distribuci a relativní délce Casparyho proužků vůči radiální stěně, pouze krátké nevětvené postranní kořeny je tvoří kratší. Také následná tvorba suberinové lamely a vytvoření terciární stěny je méně rozsáhlá u krátkých postranních kořenů. Naopak kultivační podmínky ukázaly silný vliv na vývoj endodermis. Relativní šířka Casparyho proužků a vytváření suberinové lamely byly nejvíce stimulovány působením kadmia a ve směsi písku a perlitu. Oproti tomu endodermis se vytvářela slaběji v hypoxických typech kultivace - stagnantní hydroponie, hydroponie s organickými kyselinami a v zaplavené půdě, kdy primární kořeny nevytvářely třetí stádium vývoje endodermis. Obecně lze shrnout, že nejcitlivěji na různé podmínky prostředí reagují právě krátké nevětvené postranní kořeny.

Exodermální Casparyho proužky a suberinová lamela se tvoří v primárních i postranních kořenech, v postranních kořenech (zejména v krátkých) v menší míře. Velmi zajímavým výsledkem je pozorování silných suberinových lamel v exodermis hlavního i postranních kořenů (zejm. ve stagnantních podmínkách), avšak bez současné detekce Casparyho proužků. Výsledky získané z histochemické detekce ligninu pomocí berberin hemisulfátu byly proto doplněny metodou transmisní elektronové mikroskopie. Tato metodika se však ukázala jako nedostatečná pro detekci exodermálních Casparyho proužků, které se zřejmě nějakým způsobem odlišují od těch vytvářených v endodermis. Třetí stádium vývoje exodermis jsme nepozorovali ani u primárních ani u postranních kořenů. Naše výsledky potvrdily již známá data o vlivu prostředí na diferenciaci exodermis v hlavním kořenu. Nejpodobněji hlavním kořenům reagují dlouhé větvené postranní kořeny. V kultivacích s pevným substrátem, jako je ne/zaplavená půda a perlit s pískem se vytvářely širší Casparyho proužky a jejich kruh byl téměř uzavřený. Naopak suberinové lamely byly výrazně diferencovány zejména v kultivacích s nedostatkem kyslíku, jako je stagnantní

kultivace a kultivace s organickými kyselinami utužená agarem, popř. v perlitu s pískem. Naopak ve všech typech hydroponické kultivace jsme, a to zejména u krátkých postranních kořenů, nepozorovali téměř žádný vývoj Casparyho proužků a značně sníženou depozici suberinových lamel v zavzdušněných variantách. Nižší dávka kadmia lehce urychlila depozici Casparyho proužků v delších postranních kořenech, naopak vyšší dávka způsobovala změnu v uspořádání povrchových vrstev se silnými depozicemi ligninu a extracelulárního materiálu, avšak s absencí normální stavby exodermální vrstvy.

Anatomické výsledky z hydroponických kultivací jsme porovnali s testy propustnosti s využitím kyseliny jodisté. Výsledky z měření reálné vzdálenosti pohybu ukázaly, že mezi jednotlivými typy kořenů nejsou přílišné rozdíly v absolutní propustnosti povrchu kořene. Permeabilita vyjádřená v podílu primární kůry „zasažené“ kyselinou jodistou se však liší mezi jednotlivými typy kořenů. To přímo souvisí s jejich tloušťkou, jež byla mezi variantami odlišná.

### **3.2.1 Podíl práce**

V této části jsem se podílela přibližně z 45 % na experimentální práci. Ta zahrnovala přípravu ručních řezů, histochemickou detekci a dokumentaci, dále provádění testů propustnosti a následné zpracování vzorků zahrnující řezání/focení, měření tloušťky primární kůry a vyhodnocení pohybu sondy pomocí obrazové analýzy. Také jsem připravila vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii a podílela jsem se na jejich pozorování. Dále jsem provedla zhodnocení distribuce suberinových lamel a měření postranních kořenů prvního řádu v rámci morfologické analýzy kořenového systému.

### **3.2.2 Publikace**

Výsledky z této kapitoly jsou součástí manuskriptu: Tylová, E., Pecková, E., Blascheová, Z., Soukup, A. Apoplastic barriers in lateral roots of *Zea mays* L. under various environmental conditions.

## **Apoplastic barriers in lateral roots of *Zea mays* L. under various environmental conditions**

Tylová Edita<sup>a\*</sup>, Pecková Eva<sup>a</sup>, Blascheová Zuzana<sup>a</sup>, Soukup Aleš<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Experimental Plant Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44, Prague 2, Czech Republic

### **\*Corresponding author:**

Edita Tylová  
Department of Experimental Plant Biology  
Faculty of Science  
Charles University in Prague  
Viničná 5  
128 44 Prague 2  
Czech Republic  
e-mail edmunz@natur.cuni.cz  
tel. +420 22195 1679  
fax +420 22195 1704

### **Abstract**

Lateral roots form the dominant part of root system. Their permeability for entering compounds is therefore one of key determinants of plant-soil interface, but systematic insight into apoplastic barriers (endodermis, exodermis) formation has never been done. To cover the lack of information, we realized introductory broad-range anatomical study of lateral roots of *Zea mays* L. grown under various conditions/stress influences (hypoxia, low water potential, salinity, heavy metal toxicity). Our data show that maize plants respond to growth conditions with redistribution of biomass among primary root axis, long 1<sup>st</sup> order laterals, and fine laterals of higher orders. Fine laterals are favored in solid substrates, particularly in aerated soil, compared to hydroponics. The structural features of endodermis/exdodermis differ very slightly between primary root axis and long laterals across all growth treatments applied. In contrast, fine laterals present the part of complex root system with less differentiated barriers, but with the highest responsiveness towards environmental conditions.

**Key words:** lateral roots, exodermis, endodermis, apoplastic barriers, stress, permeability, branching

## **Introduction**

Plant's ability to maintain its internal environment is joined with selective uptake of necessary nutrients and exclusion of potentially harmful phytotoxic compounds. Such selectivity of root – rhizosphere communication is related to presence of root apoplastic barriers that prevents uncontrolled apoplastic transport. Barrier's structural features (Casparian bands, suberin lamellae, tertiary walls) are established by intrinsic mechanisms during differentiation and fine-tuned in response to environment (Enstone et al. 2003; Hose et al. 2001; Lux et al. 2011). In endodermis, the response to environmental conditions includes acceleration of Casparian bands (CB) maturation (Lux et al. 2011), enlargement of CBs width (Enstone and Peterson 1998; Karahara et al. 2004), or enhanced suberin lamellae deposition (Enstone and Peterson 1998; Redjala et al. 2011).

Such developmental plasticity, a feasible adaptation of sessile plants towards heterogenic soil environment, is more pronounced in exodermis, the barrier of outer cortex. Exodermis is a common, albeit not obligatory structure of angiosperms roots (Perumalla et al. 1990). Structure of exodermis is highly variable among plant taxons (Kroemer 1903) and its higher phylogenic diversity, not seen in endodermis, should be related to environmental adaptations during speciation. Exodermis commonly differentiates more basipetaly than endodermis, but this sequence can switch in response to adverse growth conditions (Zimmermann and Steudle 1998) or might develop constitutively, as documented in species long-term adapted to stress-bearing habitats, e.g. wetlands (Soukup et al. 2002) or even possibly in old mining areas (Vaculik et al. 2012). Exodermal differentiation is under high impact of external conditions. In *Zea mays*, the differentiation of uniform single-layered exodermis occurs much further from the root apex in aerated hydroponics compared to aeroponic, soil, and vermiculite cultivations, or exposure to humid air (Enstone and Peterson 1998). Suberin lamella deposition is significantly enhanced by cold stress, hypoxia (Clarkson



et al. 1987), and osmotic stress (Perumalla and Peterson 1986). The same stimulatory effect is valid for other species, e.g. *Iris germanica* with multi-layered exodermis under exposure to humid air (Meyer et al. 2009), or *Gossypium hirsutum* (Reinhardt and Rost 1995), and *Oryza sativa* in saline conditions (Krishnamurthy et al. 2009) or hypoxia (Kotula et al. 2009). The rate of exodermis maturation further influences root apoplast permeability for water (Zimmermann et al. 2000; Zimmermann and Steudle 1998) and solutes, including adverse compounds (Lux et al. 2004; Redjala et al. 2011).

Exodermis commonly differs from endodermis in the pattern of development. In corn roots, the maturation of endodermis proceeds in distinct steps along the roots axis. Casparian bands are formed synchronously in entire endodermis close to the root apex as dot-like structures in inner part of radial cell walls, increasing later their width. Suberin lamellae deposit later, less synchronously (Enstone and Peterson 1997; Schreiber et al. 1999). In contrast, the entire process of exodermis maturation in corn root is “patchy” in both radial and longitudinal direction. The differentiation of Casparian bands is asynchronous, as even older root parts may possess only some exodermal cells with detectable Casparian bands (Enstone and Peterson 1997). The asynchronous pattern moves along also in suberin lamellae deposition, as the process seems to continue immediately after the CB establishment (Enstone and Peterson 1997).

The entire knowledge of barrier’s developmental plasticity however possesses an important gap. It comes almost solely from the studies of main root axis. Lateral roots, although forming a dominant part of absorptive surface of complex root system, are neglected because of general difficulties with handling and sample processing. Endodermal CBs of emerging primordia were shown to establish in direct connection with endodermis of mother root in *Vicia faba* (Peterson and Lefcourt 1990). Partial apoplastic leakage may occur at sites of laterals emergence (Ranathunge et al. 2005), but its contribution to overall apoplastic

bypass flow in roots is considered to be small (Faiyue et al. 2010; Moon et al. 1986) due to sealing with collar of lignified cortical cells (Soukup et al. 2002) or other resealing mechanisms. In contrast, substantial apoplast permeability of laterals themselves are indicated by some studies (Aloni et al. 1998; Enstone and Peterson 1998; Faiyue et al. 2010; Soukup et al. 2002). The presence of differentiated exodermis in lateral roots was only rarely noticed in corn (Redjala et al. 2011; Wang et al. 1995) but not in very short laterals of rice (Faiyue et al. 2010). Is the exodermis differentiation in lateral roots substantially modified, delayed/reduced compared to the main root axis under particular environmental conditions? The scarcity of anatomical data prevent any reliable answer to this question, even though the pattern of exodermal differentiation in lateral roots can significantly affect nutrient uptake and entrance of adverse compounds (heavy metals, xenobiotics, pathogens) at whole plant level, with logical implications to agriculture production and food quality.

To cover the lack of information, we realised introductory broad-range anatomical study of lateral roots of *Zea mays* L. grown under various conditions. We have focused on establishment of barrier's structural features in endodermal and exodermal layer of lateral roots of various length, age, and order. These data were compared with the main root axis and accompanied with detailed analysis of lateral root growth, distribution, and branching. The structural features of apoplastic barriers were analysed in basal parts of selected roots to compare the most advanced state of barrier differentiation in the given root type. Growth conditions were selected to induce environmental stresses that plants commonly experience worldwide: hypoxia, low water potential, salinity, heavy metal toxicity, etc.

## **Material and Methods**

### **Experimental set-up and growth conditions**

Seeds of *Zea mays* L. cv. Cefran (supplier Oseva Bzenec, Czech Republic) were germinated on moistened filter paper for four days. Seedlings with app. 5cm long primary root without any laterals were selected and transferred into experimental cultures of various hydroponis and solid substrate cultivations. Experimental cultures were designed to induce various types of stress which plants commonly experience worldwide: hypoxia, low water potential, salinity, heavy metal toxicity. The complete list of treatments is given in Tab. 1.

Hydroponic cultivations were carried in 12 L plastic containers (six plants per container). The water surface was covered with pieces of opaque plastic (polyurethane) to prevent algal growth and exposure of roots to the light. The cultivation was performed in a room with constant growth conditions: 16/8 day/night regime (irradiance 435 W m<sup>-2</sup>), 22/18 day/night thermoperiod, rel. humidity 50-75%. The basic cultivation solution was a quarter-strength Hoagland 3 nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950) with the following composition (μM): NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 3750; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 254; Ca<sup>2+</sup> 1249; K<sup>+</sup> 1501; Mg<sup>2+</sup> 510; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 510; BO<sub>3</sub><sup>3-</sup> 11.6; Fe<sup>2+</sup> 5.1; Mn<sup>2+</sup> 2.3; Zn<sup>2+</sup> 0.34; Cu<sup>2+</sup> 0.12; Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub><sup>2-</sup> 0.015. The solution was further modified according to Tab 1. The cultivation period was 14 days. The solution was renewed once within this period.

Solid media cultivations were carried in 1 L plastic containers (one plant per container) in the greenhouse. The containers were filled with appropriate substrate according to Tab 1. The cultivation period was 14 days, similarly to hydroponic cultures.

### **Morphology of primary roots**

Primary seminal roots of 18-d-old plants were subjected to detailed morphometric analysis. Roots were scanned and lengths of main root axis and 1<sup>st</sup> order laterals were

analysed semi-automatically with Smart Root software. Lengths of 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> order laterals were analysed manually with NIS elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging; <http://www.nis-elements.cz/en>). The longitudinal gradient of lateral root development along the primary root axis was followed. Primary root axis was divided into 2cm segments and lateral root lengths and numbers were quantified in each segment to gain their longitudinal distribution.

### **Anatomical analyses**

Anatomical analysis was performed on primary root subjected to morphological analysis (see above). To describe the internal structure variability in primary root axis and its laterals, root were sectioned at various positions, according to Fig. 1A. The analysis was performed in basal parts of selected roots to compare the most advanced state of barrier differentiation in the given root type. Following position were analysed: PR (primary root; third quarter of its total length from the tip), LR-L (long branched lateral roots located at the base of main root axis; segments taken 1 cm from the base), LR-M (middle-length branched laterals located at the third quarter of main root axis length; segments taken 1 cm from the base), and LR-S (short unbranched laterals located at the ½ of main root axis; segments taken 1 cm from the base). In addition, brace roots developing at stem nodes above the substrate were involved; segments were taken at position 1 cm behind the root base. The analysis covers three plants per treatment and three roots of particular type per position and plant. The lengths of lateral roots selected for anatomical analysis are given in Tab. 2.

Roots were fixed in 4% formaldehyde in phosphate buffer. Segments (0.5cm) at the given positions were hand sectioned (approx. 150µm) and stained in Sudan Red 7B (0.01% w/v; 1 h) (Brundrett et al. 1991), or berberine hemisulfate (0.1% aq.; 1 h) (Brundrett et al. 1988) counterstained with Crystal Violet (0.05% aq.; 10 min). Sections were mounted in 65% aq. glycerol and observed with an Olympus BX51 microscope (Olympus Corp., Tokyo,

Japan), supplemented with UV Olympus U-MWU filter block, and Apogee U4000 digital camera (Apogee Imaging Systems, Inc., Roseville, CA, USA). The presence of differentiated exodermal/endodermal Casparian bands (CB) and suberin lamellae (SL) were analysed on three primary roots per treatment. The continuity of endodermal/exodermal layer (distribution of cells with detectable CB or SL) was studied. The roots were divided into five categories according to suberin lamella (SL) deposition in cells of endodermal or exodermal layer: 0 (no cells with detectable SL), I (<20% of cells with SL), II ( $\pm$ 50% of cells with SL), III (>90% cells with SL), IV (complete layer of cells with SL). Similar categories were applied for CB occurrence. The radial width of endodermal/exodermal CB was estimated using image analysis software NIS Elements AR 3.22.05 (Laboratory Imaging) on berberine-stained root segments. For transmission electron microscopy, root segments were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1M, pH 7.2), post-fixed in 2% (w/v) osmium tetroxide in the same buffer, and embedded in LR White resin after dehydration in ethanol series. The ultra-thin sections were observed under JEOL JEM-1011 microscope equipped with Veleta CCD camera, and Olympus Soft Imaging Solution GmbH software.

Surface permeability was assayed with periodic acid ( $H_5IO_6$ ) as an apoplastic tracer. Plants with intact primary roots were sequentially immersed into 0.1% aq. solution of  $H_5IO_6$  (30 min) and reducing solution (30 min) according to (Soukup et al. 2007). Diluted periodic acid (0.02%  $H_5IO_6$ ) was not sufficiently effective. It rarely crossed exodermis (Fig. 8I-J), even in tiny second order laterals (Fig. 8J). Alternative tracer solutions came up with some limitations (Pecková, unpublished results). Modification of cell wall components by penetrating periodic acid were detected with Schiff's solution (Pearse 1968) on free hand sections of root segments sampled at positions given in Fig. 1A. The permeability of root tissues was quantified as the depth of tracer penetration and related to width of root cortex plus rhizodermis.

## **Statistics**

Statistical evaluation was performed using NCSS 2000 and PASS 2000 software (Jerry Hintze, 1996. NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, Utah). The effects of species (sp.), treatment (tr.) and interactions (int.) were analyzed with analysis of variance (GLM ANOVA). The differences among species and treatments were further analyzed with Bonferroni Multiple Comparison test; the results are expressed with different letters in figures. Correlations were analyzed with Correlation Matrix (Spearman correlation coefficient). The normal distribution of residuals and other assumptions were tested using the Descriptive Statistics section of NCSS software.

## **Results**

### **Root growth and branching**

Growth conditions significantly affected root system architecture (Fig. 1B-J). The total length of primary root axis was the longest in AER treatment, followed by SOIL, AER+SALT, AER+5Cd, and PER, while very short axis occurred in AER+50Cd, STAG, STAG+AO, and FLO treatments (Tab. 2;  $p < 0.001$ , ANOVA, Bonf. test). Primary roots in SOIL and AER treatments were extensively branched, but the distribution of laterals differed. High number of 1<sup>st</sup> order laterals and very short 2<sup>nd</sup> order laterals occurred in AER treatment. In contrast, SOIL grown roots possessed slightly longer 2<sup>nd</sup> order laterals and the branching continued up to 3<sup>rd</sup> order. Roots in other treatments had shorter total length and number of laterals, with minor occurrence of 3<sup>rd</sup> order laterals (Tab. 2, Fig. 1B-J). The overall distribution of root growth between main root axis and laterals (calculated as the ratio between length of main root axis and total length of all the laterals; PR/LR in Tab. 2) was lower in SOIL, AER, and AER+5Cd treatments compared to AER+50Cd ( $p < 0.05$ , ANOVA, Bonf. test). Other treatments did not significantly differ (Tab. 2).

In addition, the distribution of 1<sup>st</sup> order laterals along the primary root axis changed in response to treatments (Fig. 2A-I). In AER, the density of 1<sup>st</sup> laterals remained fairly constant from basal to apical part of main root axis and mean length of those laterals gradually decreased in clear longitudinal gradient (Fig. 2A). Similar distribution occurred also in almost all the other hydroponic treatments (Fig. 2), but it was not maintained in AER+SALT with clear patches of shorter and longer laterals along the main axis (Fig. 1G and 2D). The most conspicuous difference was however found in SOIL grown roots (Fig. 2C). In those roots, 1<sup>st</sup> order laterals were concentrated in basal part of primary root. The lower density of laterals in younger parts was compensated with their pronounced elongation (higher mean length) and their length distribution was significantly more heterogeneous (Fig. 2C).

In all treatments, significant number of 1<sup>st</sup> order laterals exhibited time-limited growth. We calculated the frequency of short (>2cm) 1<sup>st</sup> order laterals along the longitudinal gradient. Short roots occurred in significant amounts (>20%) even in older basal part of root axis where co-occurred with very long branched ones. Their frequency differed among treatments (Fig. 2A-I), the most homogenous distribution were found in AER (Fig. 2A).

### **Endodermis differentiation**

The structural features of apoplastic barriers were analysed in basal parts of seminal primary roots (PR), laterals (LR), and nodal brace roots to compare the most advanced state of barrier differentiation in the given root type. Berberine staining proved complete endodermal layer with Casparian bands (CB) in all analysed basal root segments (Table 3, Fig. 3A-D, Q-T), including short ( $\pm 0.5$ cm) 2<sup>nd</sup> order laterals (Fig. 3Y). Across all the treatments, the width of endodermal CBs was affected by growth conditions rather than root type (Fig. 4A-D). The relative width of CBs (expressed as the % of radial wall) varied surprisingly little among PR and branched laterals LR-L and LR-M ( $p>0.5$ ; Fig. 4A-C), being

shorter only in small ( $\pm 2$ cm) young unbranched laterals LR-S (by 23% on average;  $p < 0.001$ , GLM ANOVA; Fig. 4D). In contrast, the absolute width of CBs differed significantly among all root types. Across all the treatments, the absolute width was ( $\mu\text{m}$ ) 5.0; 3.6; 2.7; 1.8 in PR, LR-L, LR-M, and LR-S, respectively ( $p < 0.001$ , GLM ANOVA).

Growth conditions affected CBs width considerably. Across all examined root segments, cadmium exposure (AER+5Cd, AER+50Cd) and perlite cultivation (PER) triggered enlargement of relative CBs widths (by 33%, 70%, 30% on average; respectively) compared to aerated hydroponics (AER). In contrast, CBs in stagnant hydroponics (STAG, STAG+AO) were 24% and 14% shorter compared to AER ( $p < 0.001$ , GLM ANOVA). The effect of growth conditions got stronger towards shorter lateral roots (Fig. 4A-D). The most striking differences in relative length of CB occurred in young unbranched laterals LR-S (Fig. 4D). Examples of endodermal CBs are shown in Fig. 3A-D, Q-T, Y and Fig. 5A-H. We further observed irregularities in positioning of CB-like lignification that occurred in pericycle cells adjacent to damaged endodermal cells in severely stressed plants, particularly in AER+50Cd treatment (Fig. 3AE).

Suberin lamella was not present in all endodermal cells. Its deposition was asynchronous and the extent differed among root types and growth conditions. To simplify the quantification of suberin lamella deposition, roots were divided into five categories (0-IV; see Methods) according to relative incidence of endodermal cells with mature SL in analysed root segments. On average, primary roots of all treatments fit the category III-IV or IV, with almost complete suberized endodermal layer and minor occurrence of passage cells (Table 3; Fig. 3I-L). The longest branched laterals (LR-L) did not significantly differ from primary roots (Table 3;  $p > 0.05$ ), but the extent of suberization was lower in shorter laterals LR-M and LR-S (Table 3;  $p < 0.001$ , GLM ANOVA, Bonf.test). Cultivation in PER, AER+5Cd, and AER+50Cd enhanced the suberization compared to STAG, STAG+AO, and FLO



treatments. The response to treatments was strongly expressed in short lateral roots (LR-S), being almost negligible in long laterals LR-L and PR axis (Table 3;  $p < 0.001$ , GLM ANOVA). Short lateral roots were clearly the principal components of roots system responding most intensively to growth conditions.

Tertiary walls developed in basal part of primary roots in AER, PER, AER+SALT, SOIL, AER+5Cd, and AER+50Cd treatments, but were only rarely detected in STAG, STAG+AO and FLO treatments (Fig. 3A-D and 5A-D). Massive tertiary wall deposition occurred in AER+50Cd treatment (Fig. 3C and 5D). Tertiary walls were also found in long lateral roots (LR-L). In PER, SOIL, and AER+SALT, all examined LR-L possessed tertiary walls. In other treatments, tertiary walls were detected only in some of analysed LR-L. Shorter laterals (LR-M and LR-S) lacked endodermal tertiary walls, with the exception of perlite cultivation (PER) and cadmium exposure (AER+50Cd). In those two treatments, tertiary walls were often but not always deposited in endodermal cells (Fig. 5E-H), sometimes in irregular “patchy” pattern (Fig. 3AA).

### **Exodermis differentiation**

Complete exodermal layer with differentiated CBs, here defined as radial parts of cell walls stained with berberine hemisulfate/ crystal violet, were found in basal parts of PR axis across all the treatments, with the only exception of STAG treatment (Table 3, Fig. 3E-H). Exodermis of STAG grown plants possessed well-developed suberin lamellae (Fig. 3P), but berberine staining failed to detect lignified CBs although detection was positive in endodermal CB excluding the possibility of detection failure (Fig. 3H). CBs were observed only in a few exodermal cells in this treatment (Table 3). The presence of exodermal CBs were further checked using TEM approach. Unfortunately, this method failed to show discernible exodermal CBs even in those root segments showing clear berberine staining in

exodermis and in spite of the perfect visualisation of endodermal CB on the same ultra-thin sections (Fig. 5I-L).

Lateral roots obviously differentiate exodermal CBs, but the occurrence of exodermal cells with CBs was significantly lower compared to primary roots (Table 3, Fig. 3Q-T,  $Y$   $p < 0.001$ , GLM ANOVA). The absence of berberine-detectable exodermal CBs in lateral roots was frequent in all hydroponic treatments, although mild cadmium stress ( $5\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) slightly enhanced CBs establishment, particularly in long laterals (LR-L) (Table 3). Further increase in applied cadmium concentration ( $50\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) did not intensify this effect. It rather caused the disruption of standard developmental pattern in outer cortex of lateral roots related to cellular damage. In such case CB-like lignification established in incorrect cortex layer (Fig. 3AD) and middle cortex underwent extensive lignification (Fig. 3AC) and massive deposition of extracellular material in intracellular spaces (Fig. 3AB) as an injury response. These irregularities seemed to compensate lack of properly differentiated exodermal CBs in affected lateral roots. Irregularities occurred also in salt stressed lateral roots, e.g. locally doubled exodermal layer (Fig. 3AF), but the frequency was lower. In contrast to hydroponics, plants cultivated in solid substrates (PER, FLO, and SOIL treatments) possessed well-detectable exodermal CBs even in very short young unbranched laterals (LR-S) (Table 3, Fig. 3R).

Across all the treatments, the relative width of existing/differentiated exodermal CB expressed as the percentage of radial wall was significantly higher in primary root (69%) compared to laterals (55%, 54%, and 59% in LR-L, LR-M, and LR-S, respectively;  $p < 0.05$ , GLM ANOVA; Fig. 4E-H). Similar trend were found for absolute widths ( $\mu\text{m}$ ): 9.4 in PR compared to 6.7, 5.2, and 4.8 in LR-L, LR-M, and LR-S, respectively ( $p < 0.001$ , GLM ANOVA, data not shown). Laterals did not significantly differ from each other. Roots without detectable exodermal CB (zero values) were excluded for this analysis.

The CB width responded to growth conditions only slightly. Across all root types, the longest exodermal CBs (in % of the radial wall) were found in sand-perlite mixture, while AER and SOIL treatments were at the opposite side of the spectrum (Fig. 4E-H).

Suberization of exodermal layer was almost complete in basal parts of primary roots in all the treatments (Table 3; examples in Fig. 3M-P and 5L-M). The presence of conspicuous exodermal SL was proved even in roots lacking lignified exodermal CBs detectable with berberine hemisulphate (compare Fig. 3H and 3P). We have identified such alteration of exodermal development particularly in STAG and STAG+AO treatments, in all root types including primary root and laterals of first and second order. Across all treatments, the extent of exodermal suberization (expressed as the relative occurrence of cells with detectable SL) was significantly lower in middle-length and short lateral roots compared to primary root and long laterals (Table 3,  $p < 0.001$ , GLM ANOVA), which act as principal axis of root system. Such variation in exodermal suberization was not in plant grown in sand-perlite mixture (PER treatment) with highly suberized exodermis in all examined root categories (Table 3) including short unbranched first order laterals (LR-S; Fig. 3V). Examples of exodermal suberin lamellae in LR-S are given in Fig. 3U-X; in second order laterals in Fig. 3Z.

Neither primary roots nor laterals did not deposited tertiary walls in exodermis. Examples of exodermal cells without signs of cell wall thickening are documented on TEM photographs in Fig. 5I-L.

### **Differentiation of surface layers in brace roots**

To cover the whole range of root surface layers differentiation in maize roots, we further examined brace roots developing on stem nodes in two-month old plants grown in aerated hydroponics. The basal part (2-3cm) of those roots developed above the surface of

cultivation solution, the remaining part was submerged. Such exposure towards atmosphere changed the pattern of differentiation in root surface layers conspicuously. In basal emerged part (examined at the position 1cm from the base), no sign of exodermis differentiation (CBs, suberin lamellae, changes in cell shape) were found (Fig. 6A-C). In contrast, rhizodermis went through a massive lignification that gradually extended towards sclerified outer cortical layers (Fig. 6B). Interestingly, local disruption of massive rhizodermis lignification was compensated with enhanced lignification of outer cortex and with the occurrence of CB-like lignifications in rhizodermis (Fig. 6D).

In more distal submerged root part (examined 4cm from the base), standard developmental pattern of outer cortex occurred with well established exodermis (CBs, suberin lamellae) and without rhizodermis lignification (Fig. 6E-G).

### **Root surface permeability and root thickness**

Surface permeability within the root system was tested in plants from hydroponics to ensure non-destructive transfer of plants into 0.1%  $H_5IO_6$  tracer solution. The assay identified sites of lateral root emergence and areas of locally disrupted outermost layers as the sites with the highest surface permeability of the root (Fig 8A). For further evaluation of root surface permeability for different root types these sites were excluded. Across all the treatments, the percentage of root cortex reached by the tracer in 30min assay differed among root types. In absolute values, the real distance ( $\mu m$ ) of tracer penetration from surface towards stele was on average 81.1 $\mu m$  in PR, compared to 99.5 and 102.3 $\mu m$  in LR-S and second order laterals ( $p < 0.05$ , GLM ANOVA). LR-L and LR-M (95-96.9 $\mu m$ ) did not differ from PR ( $p > 0.05$ , GLM ANOVA, Bonf. test; Fig. 7).

However, periodic acid passed 31.2% of root cortex in main roots, 72.3% in LR-L, 85-86% in LR-M and LR-S, and 103% in second order laterals, on average ( $p < 0.001$ , GLM

ANOVA). The value above 100% means the break through the endodermal layers into stele. The percentage of cortex hit by the tracer clearly correlated with root diameter (Spearman correlation coefficient: -0.8;  $p < 0.001$ ; examples in Fig. 8B, D-G).

The comparison of roots grown under various conditions of hydroponic treatments (AER, AER+5Cd, AER+50Cd, AER+SALT, STAG, and STAG+AO; solid substrates were excluded from the assay) showed differences in permeability in response to growth conditions. Across all the root types, the distance of tracer penetration was 20% lower in AER+5Cd and AER+SALT treatments compared to AER and AER+50Cd (Fig. 7;  $p < 0.001$ , GLM ANOVA, Bonf. test). Other treatments did not significantly differ.

The average thickness ( $\mu\text{m}$ ) of cortex + rhizodermis gradually decreased from 262.2 $\mu\text{m}$  in PR to 133.0 $\mu\text{m}$  in LR-L, 110.5-115.5 $\mu\text{m}$  in LR-M and LR-S, and 91.5 $\mu\text{m}$  in 2<sup>nd</sup> order laterals ( $p < 0.001$ , GLM ANOVA, Bonf. test). The treatment conditions affected the thickness of fine laterals (LR-M, LR-S, and 2<sup>nd</sup> order laterals) but not of PR and LR-L. Thinner laterals generally occurred in FLO, AER, AER+5Cd, and SOIL treatments, while AER+50Cd, STAG, and STAG+AO were on the other side of the spectrum (Fig. 7).

## **Discussion**

This anatomical study presents the first systematic insight into variability of apoplastic barriers differentiation in various types of roots within the root system. Fine laterals form dominant part of root system surface. The root system might be intuitively seen as a system of fine “more open roots”, which are distributed into the space by thicker roots of lower orders. However such might be misleading in some cases – e.g. root system of roots without secondary thickening. In such cases the basipetal gradient within individual roots might be the principal factor of permeability distribution within the root system.

The growth, branching and permeability for entering compounds are therefore key determinants of plant-soil interface. Unfortunately, huge variability in size and thickness make any general conclusion about the apoplast permeability of lateral roots rather difficult to make. High developmental plasticity of particular root development further increases variation of the results. Together with laborious sample processing makes this variation such evaluation not a straightforward task. To face this challenge, we analysed representatives of maize 1<sup>st</sup> order laterals roots differing in length and position on maternal root (see Fig. 1A) together with representatives of 2<sup>nd</sup> order laterals. As the pattern of lateral root development responds strongly to environmental conditions, we have compared roots from six hydroponic treatments and three solid substrate cultivations (Tab. 1) to make more general conclusions.

The pattern of lateral root development changed significantly in response to treatments. All stress factors (salinity, cadmium, or hypoxia) decreased length of primary root and its laterals compare to favourable conditions of aerated hydroponics and soil. Previous comparison of soil and hydroponic treatments proved soil-grown roots as more extensively branched (Redjala et al. 2011). Our detailed analysis showed that branching to higher orders determines such difference. Soil-grown roots had higher proportion of fine laterals of higher orders (2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup>). In contrast, roots in aerated hydroponics formed high number of very short unbranched 2<sup>nd</sup> order laterals. These two treatments differed also in distribution of 1<sup>st</sup> order laterals along the main axis. In aerated hydroponics, the density was fairly constant and lengths of laterals gradually decreased acropetaly. In soil, the distribution was significantly less homogenous, which support the developmental plasticity of lateral root development in response to heterogeneous soil environment (Svistoonoff et al. 2007; Walch-Liu et al. 2006).

Lateral roots selected for anatomical analyses represent three categories of 1<sup>st</sup> order lateral roots – the longest extensively branched laterals emerging at the base of primary root (LR-L, 2-17cm in dependence of treatment conditions), shorter branched laterals located at  $\frac{3}{4}$

of main root axis (LR-M,  $\pm 5\text{cm}$ ) and very short unbranched ones (LR-S,  $\pm 2\text{cm}$ ) emerging in the middle zone of primary root. Although LR-S are the youngest 1<sup>st</sup> order laterals analysed in our study, they do not represent actively growing laterals just after emergence, because the zone of primordia emergence is located more distally. They rather represent laterals with time-limited growth activity. The early cessation of root apical meristem (RAM) activity in some laterals (approx. 10%) was repeatedly documented in field grown maize roots (Cahn et al. 1989; Pagès and Pellerin 1994; Varney and McCully 1991). In our study, very short roots ( $< 2\text{cm}$ ) occurred in close vicinity of very long branched neighbours along the whole main axis, but their distribution differed among treatments. In aerated hydroponics the frequency gradually decreased to zero towards primary root base, in soil-grown roots the frequency remained above 30% even in basal zones. Such selective maintenance of RAM activity may help plants to balance the costs of root system growth with acquisition of resources in highly heterogenic soil environment. We can speculate that maintenance of growth activity in all emerging laterals is worthless wasting. The enhanced lateral root growth in nutrient-rich patches (Drew 1975), hydrotropism (Cassab et al. 2013; Eapen et al. 2005), or growth relocation in stress avoidance (Potters et al. 2007) are strategies comprising to the effectiveness of root system based on selective development of some laterals. The early cessation of growth in some laterals seems to be part of root system developmental program as we found laterals shorter 2cm located at basal segments of primary roots in aerated hydroponics although nutrient solution is more homogenous environment compared to soil.

### **Endodermis differentiation in lateral roots**

Endodermis of lateral roots establish quite early, in a short distance behind the tip, and in direct connection with endodermis of parent root (Peterson and Lefcourt 1990). We can therefore assume tight similarity in endodermal maturation among main root and laterals. In

agreement, several endodermal characteristic of basal segments (with the most advanced state of maturation) did not significantly differ between main root axis and the longest branched laterals (LR-L). Laterals delayed only in tertiary wall deposition, but relative CB width and extent of SL deposition were similar. Such minor differences were further confirmed for their distal segments (at the position of first emerging primordia; data not shown). In contrast, short branched laterals (LR-M) and particularly very short unbranched ones (LR-S) had shorter endodermal CB (relative to radial wall) and lower frequency of SL or tertiary walls.

Our screening of Casparian bands using image analysis of free-hand berberine stained sections obviously overestimated the width of endodermal CBs. The values ranging among 30-80% of radial wall are higher compared to more precise data acquired by TEM approach (e.g. 21-34% (Karahara et al. 2004)). In spite of this limitation, we proved the effect of growth conditions on endodermal CBs maturation. Cadmium exposure, salt stress, and cultivation in sand-perlite mixture of low water potential enlarged CB compared to other treatments, in agreement with other studies (Karahara et al. 2004; Lux et al. 2011). The differences among treatments were particularly significant in short lateral roots. Short unbranched laterals even proceed into secondary state of endodermal maturation in cadmium treated and sand-perlite grown plants only, while SL were rarely found in these roots of other treatments. Fine laterals therefore represent the part of the complex roots system highly responsive towards environmental stress factors with respect to endodermis characteristics.

### **Exodermis maturation and apoplast permeability**

Studies focused on main root axis repeatedly shown the responsiveness of exodermal maturation towards growth conditions, with acceleration under low water potential, salinity, or exposure to toxic compounds (Enstone and Peterson 1998; Meyer et al. 2009; Redjala et al. 2011; Reinhardt and Rost 1995). The data collected in the present study show that similar



acceleration occurs in lateral roots. First-order laterals in all hydroponic treatments possessed only small patches of detectable CBs or SL in outer cortex, in contrast with plants cultivated in solid substrates (particularly in sand-perlite mixture) with almost complete primary exodermis even in very short ( $\pm 2$ cm) unbranched laterals. In agreement, exodermis were proved in field-grown first-order laterals of maize (Wang et al. 1995). From this point of view, contribution of lateral roots to the maintenance of plant internal environment by regulation of solute entrance seems quite important. Unfortunately, the apoplast permeability of lateral roots grown in solid substrates can be tested with substantial limitations only. The damage caused by excavation from substrate hits preferentially fine roots and changes the entrance of apoplastic tracer substantially (Moon et al. 1986). The tracer application into the growth container prior the excavation seems more reasonable as it secures intact root system, but non-specific tracer-substrate interactions can influence the results. The enhanced barrier's maturation in aeroponics (Redjala et al. 2011; Zimmermann et al. 2000), the cultivation system simulating soil conditions better than hydroponics, favours the conclusion about the significance of exodermis in soil grown plants.

In hydroponics, mild cadmium stress ( $5\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) enhanced exodermal maturation in long branched laterals, but not in shorter ones. Lateral roots thus mimicked the developmental plasticity of main roots axis only partially, in size-dependence manner. Other stress factors applied in hydroponics (salinity, organic acids, and hypoxia) did not induced changes recognizable at basal segments of examined lateral roots. In all these treatments, short laterals remained almost unsheltered with exodermis, in contrast to long branched laterals and main root axis. As the root thickness gradually decreased from primary root to long laterals and further to shorter ones, these data indicate that the gradient in exodermis formation is closely related to the size of individual roots.

Apoplastic tracer assay confirmed higher permeability of short laterals, in agreement with observations of other species in hydroponics (Faiyue et al. 2010; Soukup et al. 2002). The differences in permeability among root types were however smaller than expected. The limitation of tracer assay laid in high variability of obtained results. An explanation for this variability can be related to a broad zone of incomplete patchy exodermis with highly variable permeability that is typical for maize roots (Enstone et al. 2003). In addition, the apoplastic tracer (0.1%  $\text{H}_5\text{IO}_6$ ) often overcame matured exodermal layer and reached the cortex, although identical tracer did not cross hypodermal layers in *Phragmites* or *Glyceria* (Soukup et al. 2007). This indicates some “weakness” of maize exodermal barrier in comparison with wetland species. In agreement, wild relative of *Zea mays*, the teosinte species *Zea nicaraguensis* with high tolerance to waterlogging, differentiates much tighter barriers (Abiko et al. 2012).

Significant alteration of lateral root anatomy in hydroponics was found only in plants under severe cadmium stress ( $50\mu\text{m Cd}^{2+}$ ). The toxicity did not induced enhancement of exodermis maturation in affected lateral roots, as we failed to detect CBs in exodermal layer. Instead, laterals were much thicker, showed extensive lignification of middle cortex and occlusions in cortical intercellular space. Similar changes, documented for *Oryza* and *Phragmites* after application of toxic cocktail of organic acids (Armstrong and Armstrong 2001) or sulphides (Armstrong and Armstrong 2005) are considered defence reactions against severe toxicity damaging root membranes (Armstrong and Armstrong 2001). In these wetland species, the decreased oxygen leakage were found in affected laterals (Armstrong and Armstrong 2001). In our study, the real distance of apoplastic tracer (0.1%  $\text{H}_5\text{IO}_6$ ) penetration from surface towards middle-cortex in  $50\mu\text{m Cd}^{2+}$  treated laterals did not significantly differed compared to other treatments. Intercellular occlusions in cortex were permeable for periodic acid tracer. The tracer however reached significantly lower portion of cortex, because

of considerable root thickness. Root thickening under cadmium exposure caused by greater cortical cell size (Maksimović et al. 2007) obviously participates in radial resistance to radial flow of water and solutes (Lux et al. 2011).

### **Altered exodermal maturation in stagnant hydroponics**

In our study, we repeatedly observed suberin lamellae in hypodermal cells lacking berberine signal of CBs, particularly in plants cultivated in stagnant hydroponics (see Fig. 2). This was not caused by the general failure of the staining procedure (berberine hemisulphate with gentian violet counterstaining) as endodermal CBs were properly stained on similar sections. Missing berberine staining do not necessary mean lack of CBs. Band plasmolysis indicating tight adhesion of plasmalema to Casparian band cell wall domain was observed in hypodermal cell lacking any berberine detectable impregnations of CBs (Enstone and Peterson 1997). We employed transmission electron microscopy (TEM), but this approach failed to provide clear proof of differentiated CBs in exodermis of hypoxia treated roots. We simply did not observe electron opaque band domain in any of examined osmium-post-fixed ultrathin sections, even in roots with clearly berberine-stained exodermal CBs. Endodermal Casparian bands were conspicuous on the same sections. Limited usability of TEM approach for exodermis is indicated also by other studies (for review see (Ma and Peterson 2003)).

Maize exodermal radial walls are thin, suberin lamellae deposition may mask lignification of CBs (Ma and Peterson 2003) that complicates their histochemical proof. Exodermal suberinization is further enhanced in stagnant hydroponics (Enstone and Peterson 2005). The deposition of suberin but not lignin correlates with resistance to oxygen leakage from roots (De Simone et al. 2003; Soukup et al. 2007) or lower hydraulic conductivity (Schreiber et al. 2005). Intensive suberinization may however explain the lack of detectable exodermal CBs in stagnant hydroponics only partially. Our data showed the most pronounced

suberinization in roots cultivated in solid substrates, particularly in sand-perlite mixture, in agreement with other studies comparing hydroponics with other types of cultivation (Enstone and Peterson 2005; Redjala et al. 2011; Zimmermann and Steudle 1998). Exodermal CBs were clearly detectable in roots of perlite grown plants in spite of such strong suberinization. Moreover, exodermal CBs were detected with berberine staining in roots grown in hypoxic treatment enriched by toxic agents (organic acids). An explanation might therefore be an altered lignin/suberin involvement in impregnation of exodermal cell walls in response to hypoxia versus toxicity. Such explanation must be further tested as the importance of lignin versus suberin in exodermal CBs formation is still not completely resolved. Endodermal CBs in *Arabidopsis* were shown to contain lignin without suberin (Naseer et al. 2012), but partial involvement of suberin in both endo- and exodermal CBs was indicated in other species (Schreiber et al. 1999; Zeier et al. 1999).

Alternatively, “missing” berberine staining of exodermal Casparian bands in hypoxia treated maize roots may raise doubt about generally accepted sequence of exodermis maturation steps. We can speculate that establishment of CBs and SL deposition are not just steps in maturation sequence, but rather processes with some degree of autonomous regulation by different environmental inputs. Such speculation needs further examination.

### **Acknowledgements:**

Authors would like to thank Prof. James L. Seago (Oswego State University, USA) for valuable discussion of results. The work was supported by COST LD 11017.

**Legends to figures:**

**Fig. 1** (A) Locations of segments analysed for the anatomical structure: PR (primary root; third quarter of its total length from the tip), LR-L (long branched lateral roots located at the base of main root axis; segments taken 1 cm from the base), LR-M (middle-length branched laterals located at the third quarter of main root axis length; segments taken 1 cm from the base); LR-S (short unbranched laterals located at the  $\frac{1}{2}$  of main root axis; segments taken 1 cm from the base). Lengths of analysed roots are given in Tab. 2. (B-J) Primary root architecture; (B) AER; (C) SOIL; (D) STAG+AO; (E) FLO; (F) STAG; (G) AER+SALT; (H) AER+5Cd; (I) AER+50Cd; (J) PER (for details of treatments see Tab. 1). Scale bars = 2cm.

**Fig. 2** (A-I) Distribution and mean length of 1<sup>st</sup> order laterals along the axis of primary root (n = 3). Total numbers of 1<sup>st</sup> order laterals in 2cm segments from root base towards the apex (white columns, left axis). Total numbers of short (<2cm) 1<sup>st</sup> order laterals in each segment (black columns, left axis). Mean length of 1<sup>st</sup> order laterals in each segment (red line, right axis). For details of treatments see Tab. 1.

**Fig. 3** (A-D; I-L) Endodermis appearance at  $\frac{3}{4}$  of primary root axis in selected treatments - Casparian bands in (A) AER, (B) PER, (C) AER+50Cd, and (D) STAG; suberin lamellae and tertiary walls in (I) AER, (J) PER, (K) AER+50Cd, and (L) STAG. (E-H; M-P) Exodermis appearance at  $\frac{3}{4}$  of primary root axis - Casparian bands in (E) AER, (F) PER, (G) AER+50Cd, and (H) STAG, suberin lamellae (M) AER, (N) PER, (O) AER+50Cd, and (P) STAG. (Q-X) Endodermis and exodermis in basal segments of short first order lateral roots (LR-S) - Casparian bands in (Q) AER, (R) PER, (S) AER+50Cd, and (T) STAG; suberin lamellae in (U) AER, (V) PER, (W) AER+50Cd, and (X) STAG. (Y-Z) Endodermis and exodermis in second order lateral root - Casparian bands (Y) and suberin lamellae (Z). (AA)

“Patchy” tertiary walls occurrence in endodermis of LR-S in PER treatment. (AB-AF) Alteration of standard developmental pattern in salt and cadmium treated plants – extracellular material accumulation in cortex in AER+50Cd treatment (AB); Casparian bands-like lignifications in cortex (AC, AD) and stele (AE) in AER+50Cd treatment; Casparian bands-like lignifications in cortex in AER+SALT treatment (AF). (A-H, Q-T, Y, AA-AF) Berberin-Crystal violet staining of lignification; (I-P, U-X, Z) Sudan Red 7B staining of suberin lamellae. Scale bars = 20µm.

**Fig. 4** (A-D) Width of endodermal and (E-H) exodermal Casparian bands (CB) expressed as the percentage (%) of radial wall (mean ± SE, n=3) in primary root (PR) and its long (LR-L), middle-length (LR-M), and short (LR-S) 1<sup>st</sup> order laterals. EN-endodermal CB; EX-exodermal CB; n.a.-not available (roots were not developed). Grey columns express positions, where exodermal CB were not detected in all analyzed roots. Casparian bands were stained with berberine hemisulphate and Crystal Violet counterstaining. Different letters indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ ; GLM ANOVA, Bonf. test). For details of treatments see Tab. 1.

**Fig. 5** (A-H) Casparian bands in endodermis and (I-K) exodermis visualized by TEM approach. (A-D) Endodermal radial walls with electron-dense CBs in primary root in (A) AER, (B) AER+SALT, (C) AER+50Cd, and (D) STAG treatments. (E-H) Endodermal CBs in short 1<sup>st</sup> order lateral roots LR-S in (E) AER, (F) AER+SALT, (G) AER+50Cd, and (H) STAG. (I-K) Exodermal radial walls in primary roots in (I) AER, (J) AER+SALT, and (L) STAG. (L-M) Detail of exodermal suberin lamellae in  $\frac{3}{4}$  of primary root in (L) AER and (M) STAG treatments; sl – suberin lamellae. For details of treatments see Tab. 1. Scale bars = 1µm, except L, M = 100nm.

**Fig. 6** (A-G) Differentiation of surface layers in brace roots emerging from stem nodes. (A-D) Basal segments exposed to atmosphere above the surface of cultivation solution – sectioned 1cm from root base. (E-F) Distal segments submerged in the solution – sectioned 4 cm from the root base. (A, E) Floroglucinol staining of lignification; (B, D, F) Berberin-Crystal violet staining of lignification; (C, G) Sudan Red 7B staining of suberin lamellae. Scale bars = 10 $\mu$ m.

**Fig. 7** Root surface permeability for apoplastic tracer ( $H_5IO_6$ ) in different root types and treatments. Total width ( $\mu$ m) of cortex plus rhizodermis (open columns) and the depth ( $\mu$ m) reached by the tracer in 30 min assay (purple columns). Primary root (PR), its long (LR-L), middle-length (LR-M), and short (LR-S) 1<sup>st</sup> order laterals; second order laterals (2<sup>nd</sup> order LR). Treatments are explained in Tab. 1.

**Fig. 8** (A, B, D-G) Root surface permeability for apoplastic tracer (0.1%  $H_5IO_6$ ); (A, B) primary root at  $\frac{3}{4}$  of its axis; (D) basal segments of long and (E) middle-length first order laterals; (F-G) second order laterals without (F) and with (G)  $H_5IO_6$  penetration into stele. (C, H) negative controls without  $H_5IO_6$  application; (C) primary root and (H) short lateral root. (I-J) Permeability for diluted tracer (0.02%  $H_5IO_6$ ); (I) primary root at  $\frac{3}{4}$  of its axis; (J) basal segments of short first order laterals. Purple coloration indicates sites affected by  $H_5IO_6$  tracer. Scale bars = 50 $\mu$ m.

Fig. 1

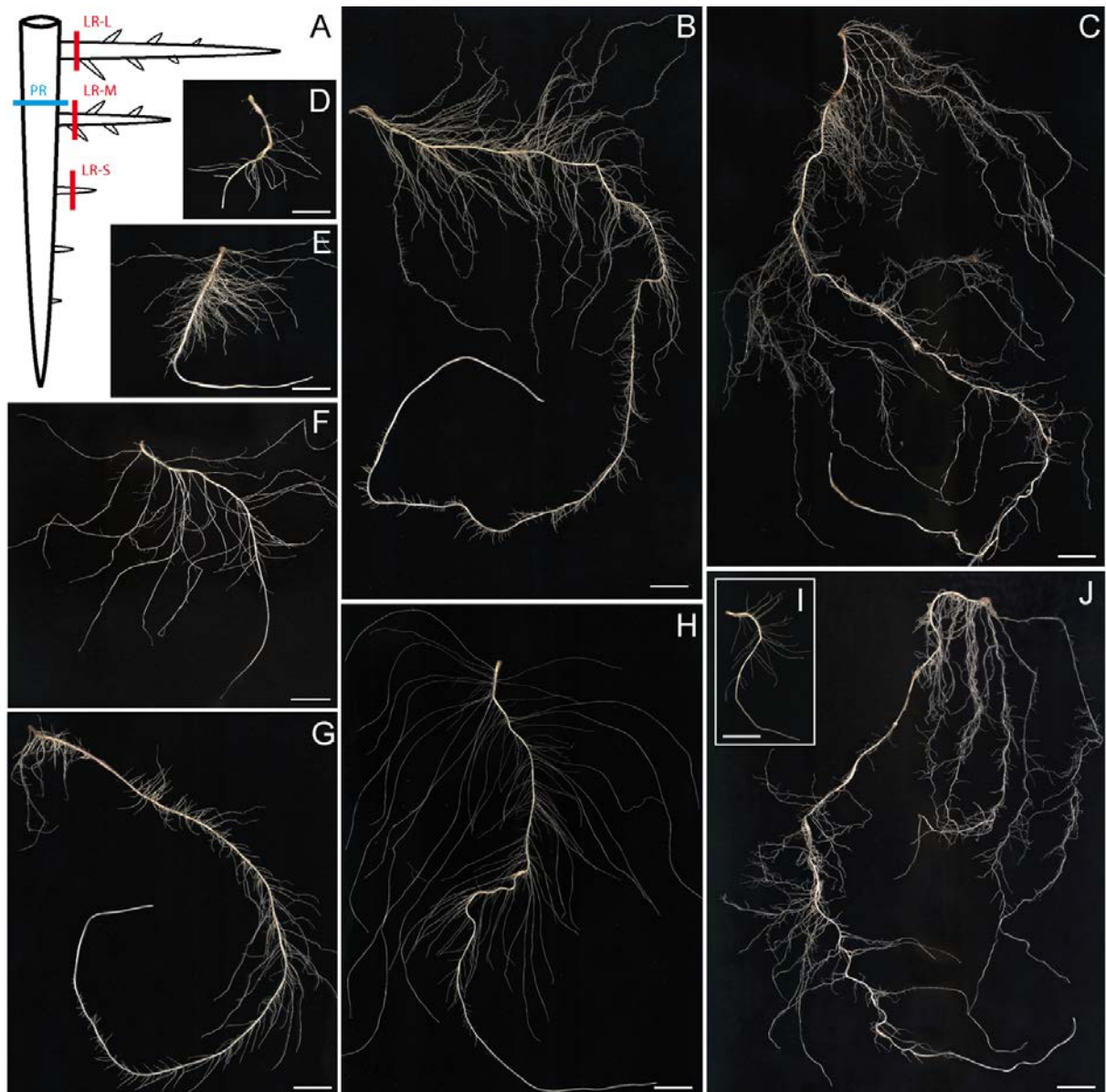




Fig. 2

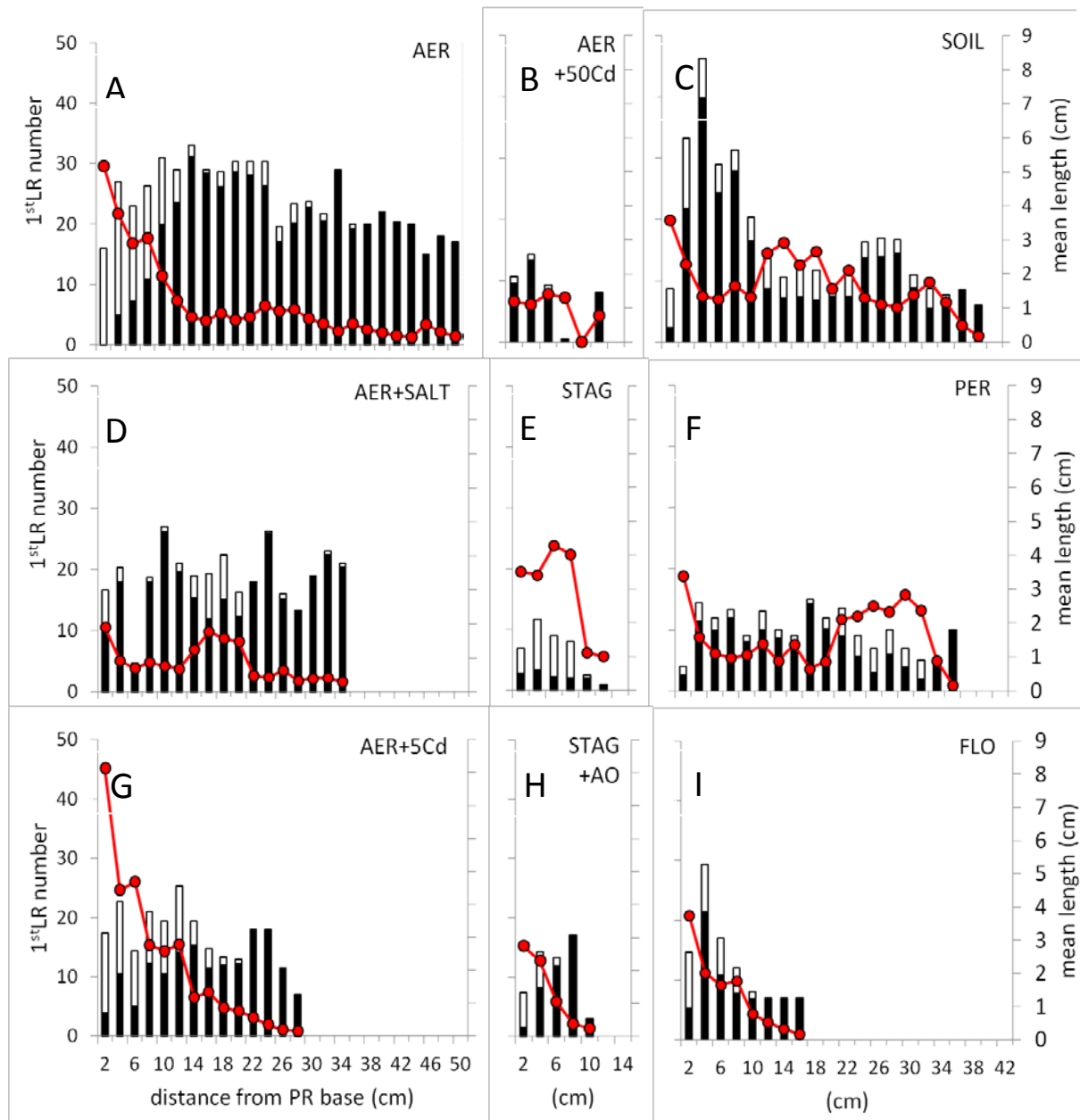


Fig. 3

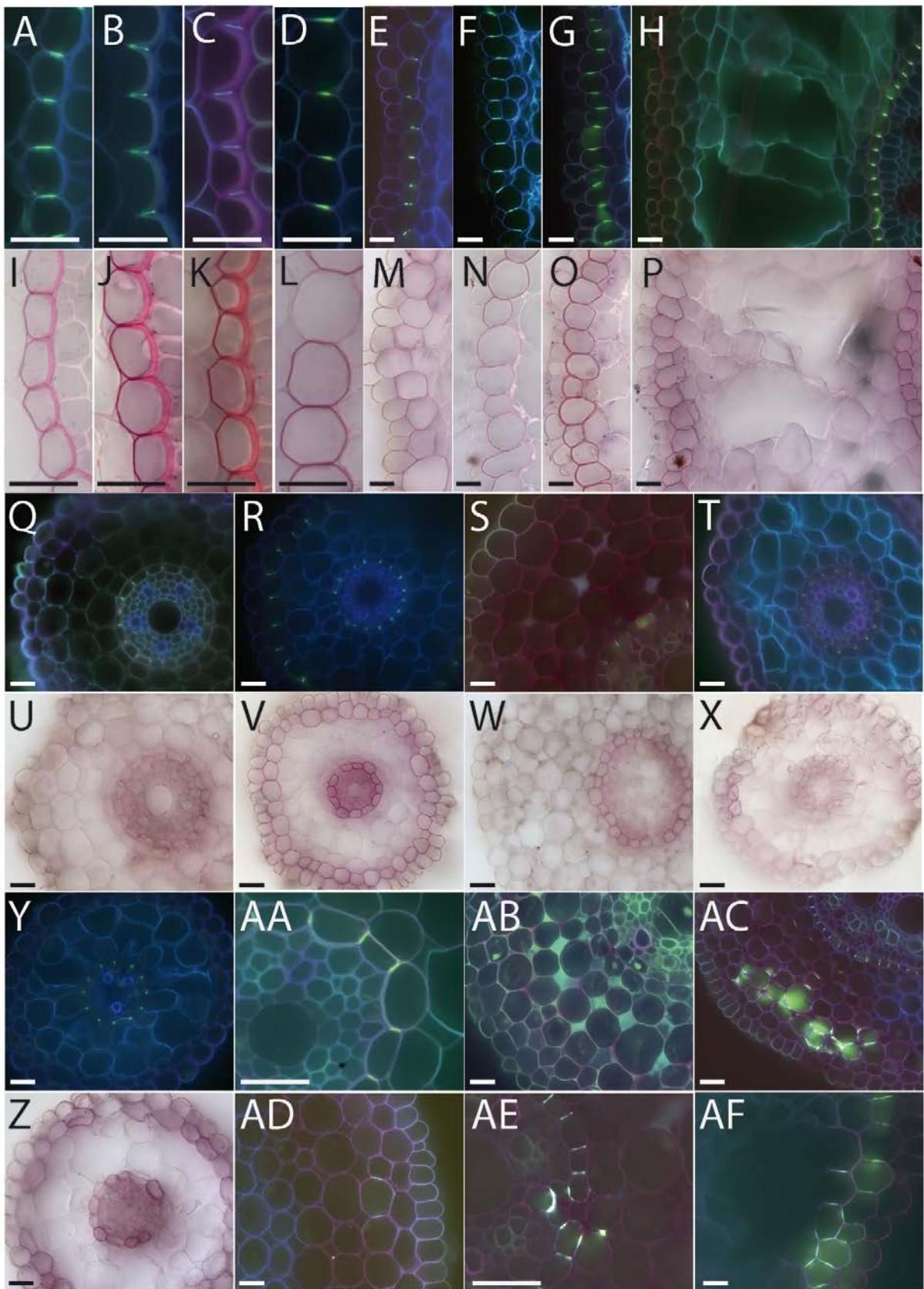


Fig. 4

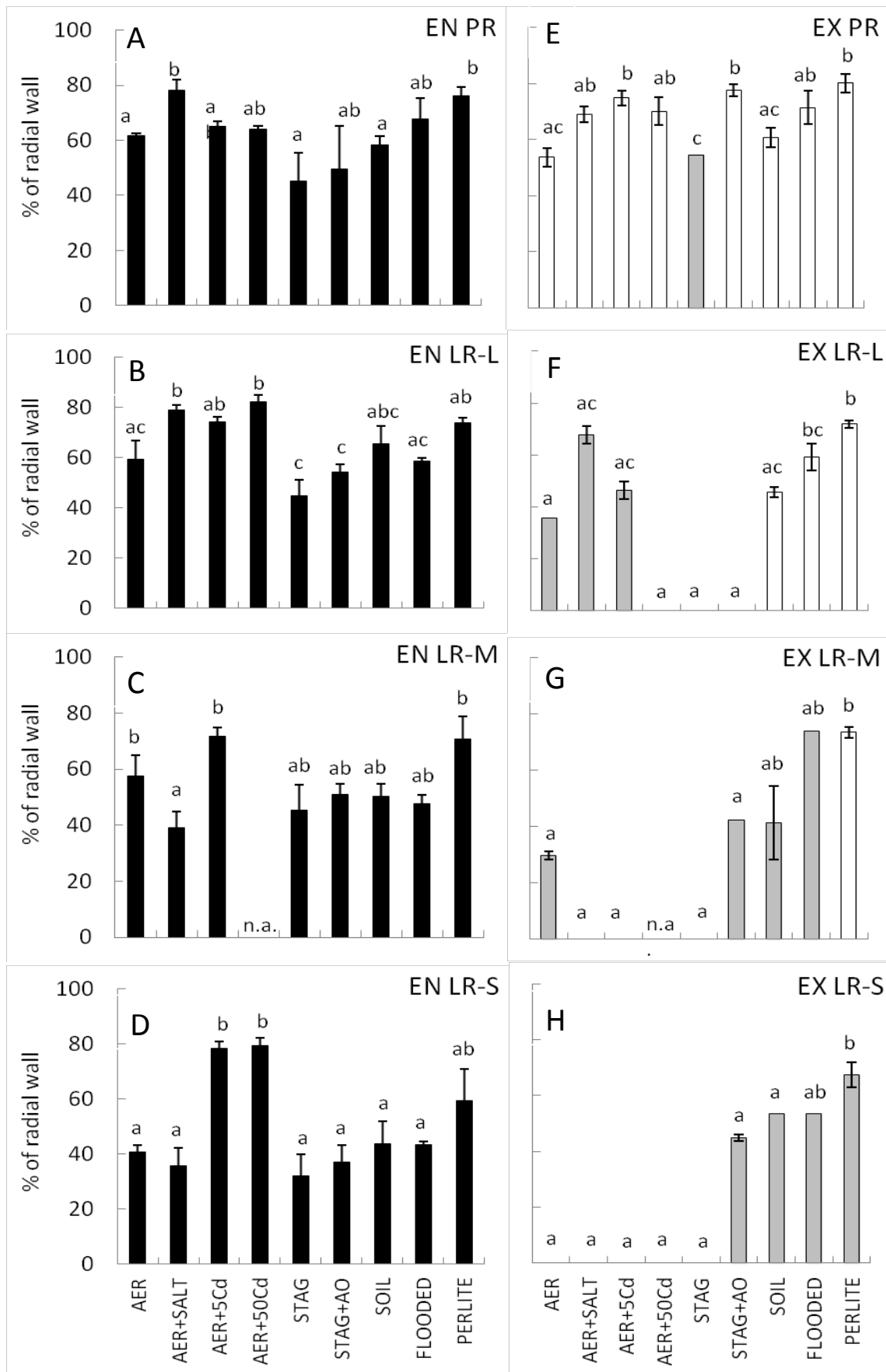


Fig. 5

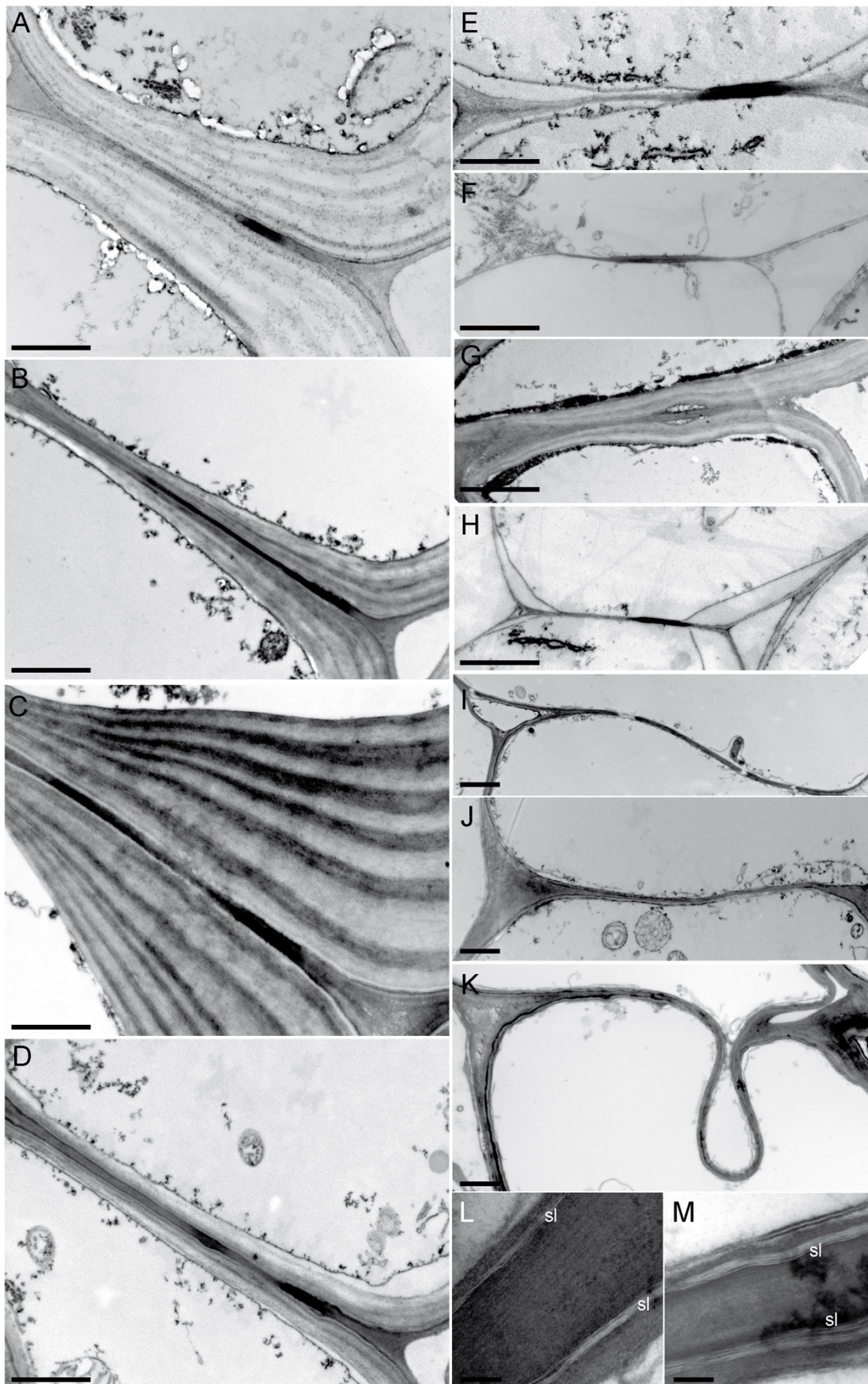


Fig. 6

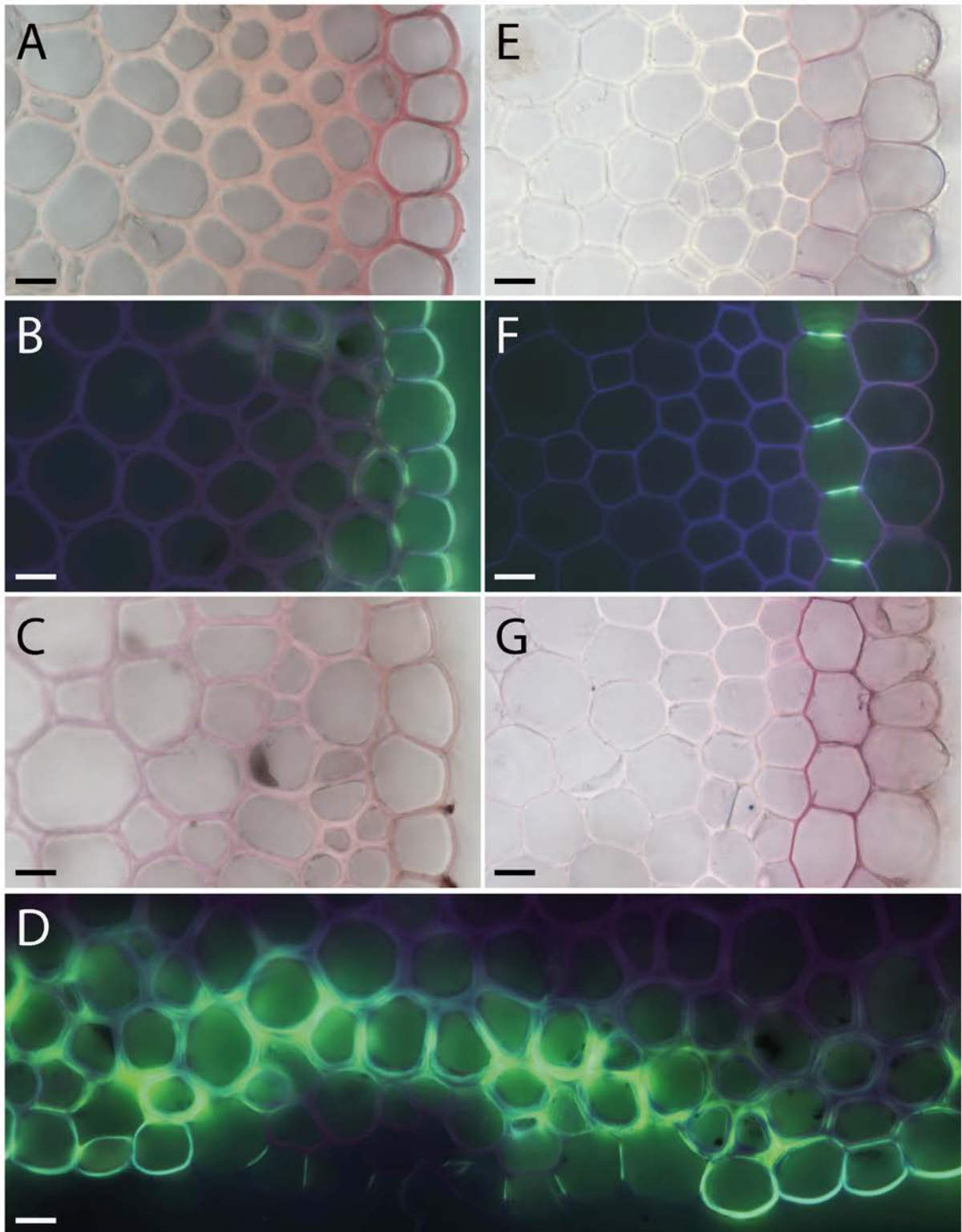


Fig. 7

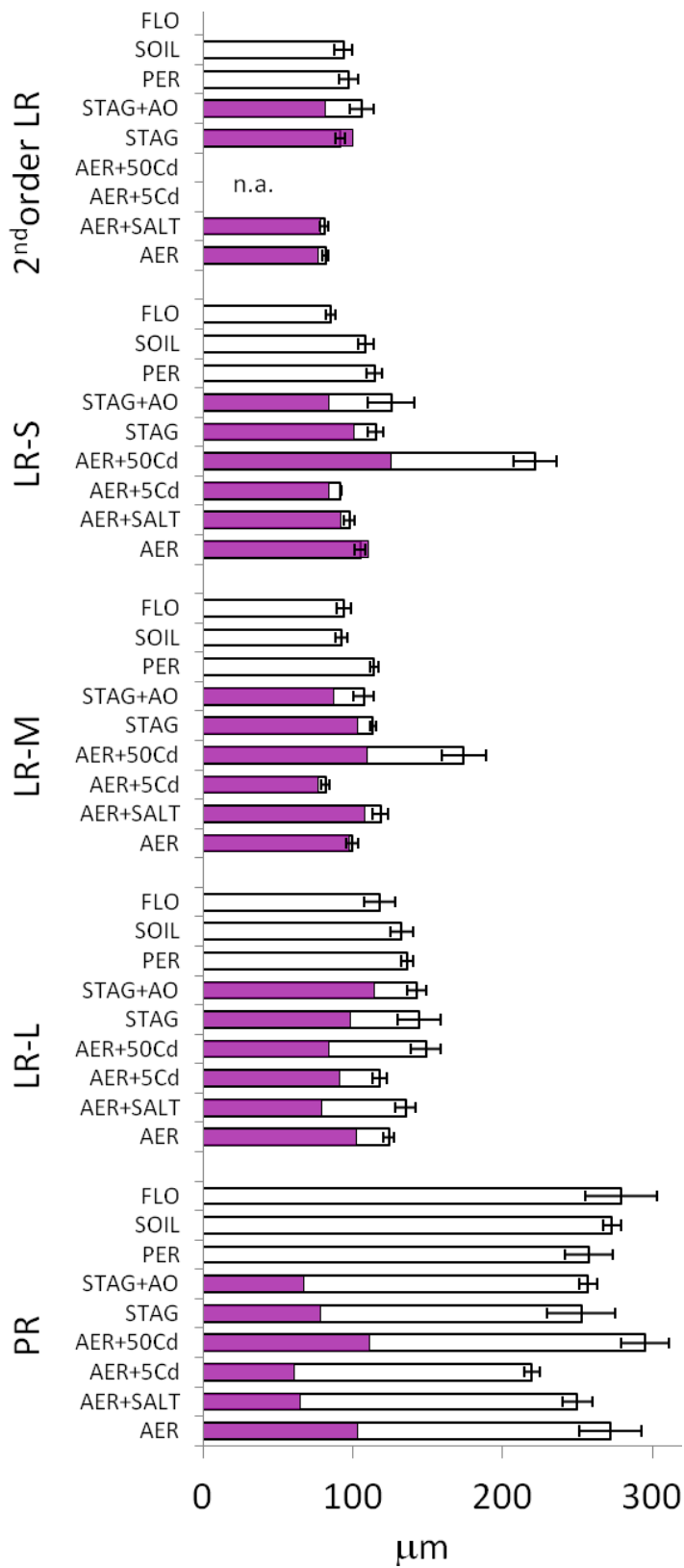
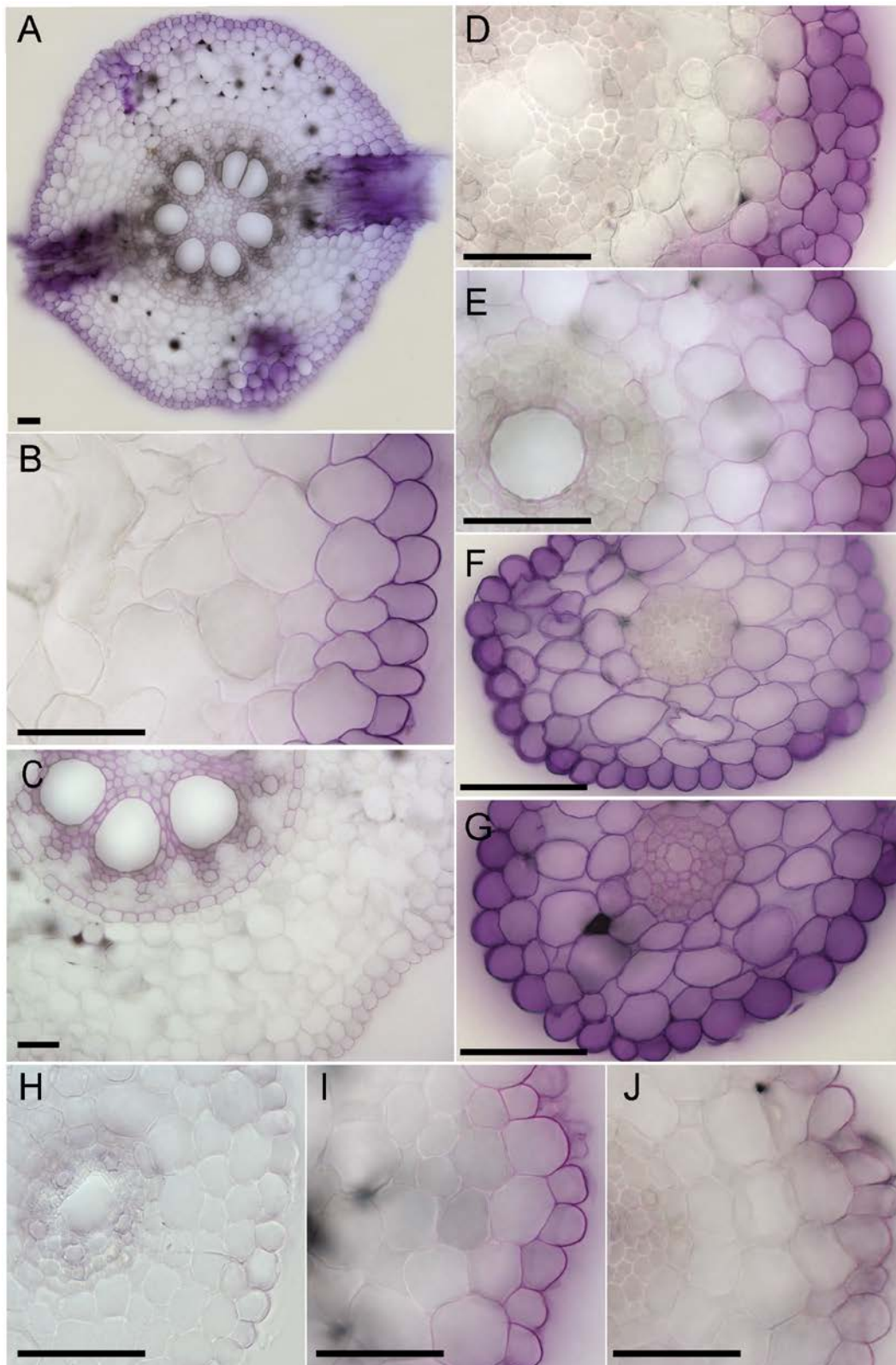


Fig. 8



**Tab. 1** Treatments applied in the study

<b>Treatment</b>	<b>Growth conditions</b>
AER	Aerated hydroponics; oxygen saturation >90%
STAG	Stagnant hydroponics with addition of 0,05% agar; O <sub>2</sub> saturation <20%
STAG+AO	Stagnant hydroponics with addition of 0,05% agar + 2mM organic acids (a mixture of acetic and formic acid; 1:1); pH adjusted to 5.7 using 1M NaOH
AER+SALT	Aerated hydroponics + 100mM NaCl
AER+5Cd	Aerated hydroponics + 5 $\mu$ M Cd <sup>2+</sup>
AER+50Cd	Aerated hydroponics + 50 $\mu$ M Cd <sup>2+</sup>
SOIL	Soil moistened with tap water
FLO	Soil flooded with tap water to 1cm above the soil surface
PER	Mixture of fine quartz sand and perlite (1:1) moistened with tap water



**Tab. 2** Biometric characteristics of primary roots in different treatments and length of laterals selected for the anatomical study (means, n=3-5).

	AER	AER	AER	AER	STAG	STAG	SOIL	FLO	PER
		+SALT	+5Cd	+50Cd		+AO			
<b>Total lengths per primary root (cm)</b>									
PR axis	58.6 <sup>c</sup>	40.6 <sup>b</sup>	35.8 <sup>b</sup>	16.1 <sup>a</sup>	13.2 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>	46.2 <sup>b</sup>	15.6 <sup>a</sup>	37.4 <sup>b</sup>
PR apic.	8.2 <sup>b</sup>	5.0 <sup>ab</sup>	6.6 <sup>b</sup>	1.6 <sup>a</sup>	4.2 <sup>ab</sup>	4.0 <sup>ab</sup>	5.7 <sup>b</sup>	5.3 <sup>ab</sup>	6.5 <sup>b</sup>
1 <sup>st</sup> LR	745 <sup>c</sup>	270 <sup>a</sup>	538 <sup>b</sup>	44.9 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	66.6 <sup>a</sup>	534 <sup>b</sup>	131 <sup>a</sup>	195 <sup>a</sup>
2 <sup>nd</sup> LR	102 <sup>ab</sup>	17.9 <sup>a</sup>	14.8 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	4.4 <sup>a</sup>	263 <sup>b</sup>	37.6 <sup>a</sup>	71.3 <sup>a</sup>
3 <sup>rd</sup> LR	0 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	15.4 <sup>b</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>
LR total	847 <sup>b</sup>	289 <sup>a</sup>	553 <sup>ab</sup>	45.3 <sup>a</sup>	110 <sup>a</sup>	71.1 <sup>a</sup>	813 <sup>b</sup>	170 <sup>a</sup>	267 <sup>a</sup>
PR /LR	0.07 <sup>a</sup>	0.14 <sup>ab</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.12 <sup>ab</sup>	0.22 <sup>ab</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.12 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>ab</sup>
<b>Total LR numbers per primary root</b>									
1 <sup>st</sup> LR	564 <sup>c</sup>	301 <sup>b</sup>	214 <sup>b</sup>	40.0 <sup>a</sup>	35.0 <sup>a</sup>	40.0 <sup>a</sup>	323 <sup>b</sup>	78.7 <sup>ab</sup>	141 <sup>ab</sup>
2 <sup>nd</sup> LR	851 <sup>b</sup>	188 <sup>a</sup>	57.0 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	25.3 <sup>a</sup>	11.7 <sup>a</sup>	417 <sup>ab</sup>	55.0 <sup>a</sup>	149 <sup>a</sup>
3 <sup>rd</sup> LR	0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	73.3 <sup>b</sup>	2.0 <sup>a</sup>	7.3 <sup>a</sup>
LR total	1414 <sup>c</sup>	490 <sup>ab</sup>	271 <sup>a</sup>	42.7 <sup>a</sup>	60.3 <sup>a</sup>	51.7 <sup>a</sup>	813 <sup>b</sup>	136 <sup>a</sup>	297 <sup>ab</sup>
<b>Mean LR lengths per primary root (cm)</b>									
1 <sup>st</sup> LR	1.3 <sup>ab</sup>	0.9 <sup>a</sup>	2.6 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	1.8 <sup>ab</sup>	1.7 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>
2 <sup>nd</sup> LR	0.05 <sup>ab</sup>	0.06 <sup>ab</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.15 <sup>ab</sup>	0.11 <sup>ab</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.34 <sup>b</sup>	0.1 <sup>ab</sup>
3 <sup>rd</sup> LR	0 <sup>a</sup>	0.002 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.004 <sup>a</sup>

---

**Lengths of laterals selected for the anatomical study (cm)**

LR-L	12.8	7.1	13.9	2.0	7.1	6.3	17.1	12.6	17.6
LR-L apic.	2.1	0.8	5.7	2.0	2.6	2.3	3.6	4.7	4.5
LR-M	4.0	2.8	n.a.	n.a.	4.3	3.7	4.4	3.9	4.9
LR-S	1.8	1.5	2.3	0.9	2.0	1.3	2.3	2.1	2.2

---

Note: PR axis – length of primary root axis; PR apic. – length of unbranched apical part of PR; 1<sup>st</sup> LR – first order laterals; 2<sup>nd</sup> LR – second order laterals; 3<sup>rd</sup> LR – third order laterals; LR-L - long branched laterals located at the base of PR; RP/LR – ratio PR axis/LR total; LR-L apic. - length of unbranched apical part of LR-L; LR-M - middle-length branched laterals located at the third quarter of PR; LR-S - short unbranched laterals located at the ½ of PR; n.a. - not available (roots were not developed). Different letters indicate significant differences among treatments (p<0.05; ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test)

**Tab. 3** Occurrence of CB/SL bearing cells in endodermal/exodermal layer (means, n=3-5)

	PR	LR-L	LR-M	LR-S	PR	LR-L	LR-M	LR-S
	<b>Endodermal CB</b>				<b>Exodermal CB</b>			
AER	IV	IV	IV	IV	IV	0-I	I	0
AER+SALT	IV	IV	IV	IV	III-IV	0-I	0	0
AER+5Cd	IV	IV	IV	IV	IV	II-III	0	0-I
AER+50Cd	IV	IV	IV	IV	IV	0	n.a.	0
STAG	IV	IV	IV	IV	0-I	0	0	0
STAG+AO	IV	IV	IV	IV	IV	0-I	0-I	I
SOIL	IV	IV	IV	IV	IV	II-III	II-III	II-III
FLOODED	IV	IV	IV	IV	IV	IV	II-III	II-III
PERLITE	IV	IV	IV	IV	III-IV	IV	III-IV	III-IV
	<b>Endodermal SL</b>				<b>Exodermal SL</b>			
AER	III-IV	III-IV	II-III	0-I	III-IV	II-III	I-II	0
AER+SALT	IV	III-IV	II-III	0-I	III-IV	I-II	0-I	0
AER+5Cd	IV	IV	III-IV	III-IV	IV	III-IV	0-I	0-I
AER+50Cd	IV	IV	n.a.	III-IV	IV	I	n.a.	0-I
STAG	III-IV	II-III	III-IV	0-I	III-IV	II	II-III	0-I
STAG+AO	IV	II-III	I-II	0-I	IV	II	II-III	I-II
SOIL	IV	III-IV	II-III	0-I	III	I-II	I	II
FLOODED	IV	III-IV	0-I	0-I	IV	III-IV	0	I-II
PERLITE	IV	IV	IV	III-IV	IV	IV	III-IV	III-IV

Note: Extent of barrier formation in primary root (PR) and its long (LR-L), middle-length (LR-M), and short (LR-S) laterals in response to treatments (n=3). Roots were divided into

categories according to the incidence of cells with developed CB/SL in endodermal/exodermal layer: 0 (0%); I (<20%); II ( $\pm$ 50%); III (>90%). IV (100%).  
Treatments: AER-aerated hydroponics; AER+SALT-aerated hydroponics + 100mM NaCl; AER+5Cd-aerated hydroponic + 5  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>; AER+50Cd-aerated hydroponic + 50  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>; STAG – stagnant hydroponics; STAG+AO – stagnant hydroponics + 2mM organic acids; SOIL – soil cultivation; FLO – cultivation in flooded soil; PER – cultivation in mixture of sand and perlite; n.a.-not available (roots were not developed).

## **References:**

- Abiko T, Kotula L, Shiono K, Malik AI, Colmer TD, Nakazono M (2012) Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea mays* ssp. *mays* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Plant, cell & environment* 35: 1618-1630
- Aloni R, Enstone DE, Peterson CA (1998) Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species. *Planta* 207: 1-7
- Armstrong J, Armstrong W (2001) Rice and Phragmites: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *American Journal of Botany* 88: 1359-1370
- Armstrong J, Armstrong W (2005) Rice: sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe<sup>2+</sup> and water uptake, and lateral root emergence. *Annals of botany* 96: 625-638
- Brundrett MC, Enstone DE, Peterson CA (1988) A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* 146: 133-142
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* 66: 111-116
- Cahn M, Zobel R, Bouldin D (1989) Relationship between root elongation rate and diameter and duration of growth of lateral roots of maize. *Plant and Soil* 119: 271-279
- Cassab GI, Eapen D, Campos ME (2013) Root hydrotropism: An update. *American journal of botany* 100: 14-24
- Clarkson D, Robards A, Stephens J, Stark M (1987) Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots; development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant, cell & environment* 10: 83-93
- De Simone O, Haase K, Müller E, Junk WJ, Hartmann K, Schreiber L, Schmidt W (2003) Apoplasmic barriers and oxygen transport properties of hypodermal cell walls in roots from four Amazonian tree species. *Plant physiology* 132: 206-217
- Drew M (1975) Comparison of the effects of a localised supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytologist* 75: 479-490
- Eapen D, Barroso ML, Ponce G, Campos ME, Cassab GI (2005) Hydrotropism: root growth responses to water. *Trends in plant science* 10: 44-50
- Enstone D, Peterson C (1998) Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant, cell & environment* 21: 837-844
- Enstone DE, Peterson CA (1997) Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis. *Canadian Journal of Botany* 75: 1188-1199
- Enstone DE, Peterson CA (2005) Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, cell & environment* 28: 444-455
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003) Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351

- Faiyue B, Al-Azzawi MJ, Flowers TJ (2010) The role of lateral roots in bypass flow in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, cell & environment* 33: 702-716
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station 347
- Hose E, Clarkson D, Steudle E, Schreiber L, Hartung W (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of experimental botany* 52: 2245-2264
- Karahara I, Ikeda A, Kondo T, Uetake Y (2004) Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219: 41-47
- Kotula L, Ranathunge K, Schreiber L, Steudle E (2009) Functional and chemical comparison of apoplastic barriers to radial oxygen loss in roots of rice (*Oryza sativa* L.) grown in aerated or deoxygenated solution. *Journal of experimental botany* 60: 2155-2167
- Krishnamurthy P, Ranathunge K, Franke R, Prakash H, Schreiber L, Mathew M (2009) The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 230: 119-134
- Kroemer K (1903) Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibl. bot* 59: 151
- Lux A, Martinka M, Vaculik M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of experimental botany* 62: 21-37
- Lux A, Šottníková A, Opatrná J, Greger M (2004) Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum* 120: 537-545
- Ma F, Peterson CA (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany* 81: 405-421
- Maksimović I, Kastori R, Krstić L, Luković J (2007) Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. *Biologia Plantarum* 51: 589-592
- Meyer CJ, Seago JL, Jr., Peterson CA (2009) Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of botany* 103: 687-702
- Moon G, Clough B, Peterson C, Allaway W (1986) Apoplastic and symplastic pathways in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. roots revealed by fluorescent tracer dyes. *Functional Plant Biology* 13: 637-648
- 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 of the United States of America* 109: 10101-10106
- Pagès L, Pellerin S (1994) Evaluation of parameters describing the root system architecture of field grown maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 164: 169-176
- Pearse A (1968) *Histochemistry (theoretical and applied)*. J. A. Churchill Ltd., London, UK
- Perumalla C, Peterson CA (1986) Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Canadian Journal of Botany* 64: 1873-1878

- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 93-112
- Peterson CA, Lefcourt BE (1990) Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Canadian journal of botany* 68: 2729-2735
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in plant science* 12: 98-105
- Ranathunge K, Steudle E, Lafitte R (2005) A new precipitation technique provides evidence for the permeability of Casparian bands to ions in young roots of corn (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, cell & environment* 28: 1450-1462
- Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, Legué V, Lux A (2011) Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environmental and Experimental Botany* 71: 241-248
- Reinhardt D, Rost T (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and experimental Botany* 35: 563-574
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K-D, Ranathunge K, Steudle E (2005) The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of experimental botany* 56: 1427-1436
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of experimental botany* 50: 1267-1280
- Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubova O (2007) Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *The New phytologist* 173: 264-278
- Soukup A, Votrubová O, Čížková H (2002) Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* 153: 277-287
- Svistoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat Genet* 39: 792-796
- Vaculik M, Konlechner C, Langer I, Adlassnig W, Puschenreiter M, Lux A, Hauser MT (2012) Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. *Environ Pollut* 163: 117-126
- Varney G, McCully M (1991) The branch roots of *Zea*. II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New phytologist* 118: 535-546
- Walch-Liu P, Ivanov, II, Filleur S, Gan Y, Remans T, Forde BG (2006) Nitrogen regulation of root branching. *Annals of botany* 97: 875-881
- Wang X, McCully M, Canny M (1995) Branch roots of *Zea*. 5: Structural features that may influence water and nutrient transport. *Botanica Acta* 108
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L (1999) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209: 1-12

Zimmermann HM, 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 HM, Steudle E (1998) Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206: 7-19



### 3.3 Testy propustnosti

Tato část zahrnuje souhrn dostupných informací o použití nejčastěji využívaných testů propustnosti, navazuje na předchozí testování, doplňuje je vlastními pokusy a obsahuje diskuzi v případě nalezených rozdílů. Pro tuto souhrnnou studii byly vybrány v literatuře nejčastěji se využívající látky, prezentující jednak malé apoplastické sondy pozorovatelné ve světlém poli ( $\text{Fe}^{2+}$ , kys. jodistá) a větší fluorescentní sondy (srážený berberin, PTS).

Oproti očekávání všechny sondy během těchto experimentů prošly v určitém rozsahu přes vytvořenou exodermální vrstvu ve třech čtvrtinách hlavního kořene kukuřice (*Zea mays*), u rýže (*Oryza sativa*) pouze kyselina jodistá. Zjistili jsme velkou variabilitu chování různé koncentrace a délky aplikace kyseliny jodisté v kořenech různých druhů. Naše výsledky také poukazují na nesnáze při použití PTS v těchto oblastech kořene. Po průchodu exodermální vrstvou,  $\text{Fe}^{2+}$ , kyselina jodistá i berberin se pohybují primární kůrou kukuřice (*Z. mays*) obdobnou rychlostí,  $\text{Fe}^{2+}$  o trochu rychleji. Dosažená vzdálenost od povrchu souvisí s délkou aplikace sondy. V oblasti apikálních vrcholů hlavních kořenů kukuřice (*Z. mays*) i rýže (*O. sativa*) jsme pozorovali rychlý průnik berberinu do vnitřních částí kořene a částečně i kyseliny jodisté, naopak téměř žádný u  $\text{Fe}^{2+}$  iontů a PTS. Pokud byla primordia postranních kořenů velmi mladá, uložená hluboko pod povrchem mateřského kořene, nebyla obarvena žádnou z testovaných sond. Naopak chování sond v prorostlých postranních kořenech bylo rozdílné.  $\text{Fe}^{2+}$  ionty se pohybovaly v postranních kořenech prvního a druhého řádu různou rychlostí, která závisela zejména na jejich tloušťce. Kyselina jodistá barvila velmi silně všechny sledované krátké postranní kořeny. Vysrážený berberin byl detekován zejména v tlustších postranních kořenech. PTS se opět ukázala jako méně vhodná sonda, neboť výstupy byly dosti nesourodé.

Naše výsledky jasně poukazují na důležitost výběru vhodné sondy a její koncentrace pro daný druh rostliny, stáří testovaného pletiva/orgánu, typu kořene a na komplikace při srovnání výsledků různě navržených experimentů. Navíc vzhledem k tomu, že u všech použitých sond byla zaznamenána jejich přítomnost v protoplastu, je na místě upozornit, že pojem „apoplastická sonda“ je poměrně relativní.

### **3.3.1. Podíl práce**

Veškeré experimenty testující apoplastické sondy jsem provedla sama. Některé pilotní pokusy byly provedeny Dr. Tylovou. Společně s Dr. Soukupem jsem se podílela na sepisování manuskriptu.

### **3.3.2 Publikace**

Výsledky z této kapitoly jsou součástí manuskriptu s názvem: Pecková, E., Tylová, E., Soukup, A. Tracing the root permeability.

## **Tracing the root permeability**

Pecková Eva<sup>1</sup>, Tylová Edita<sup>1</sup>, Soukup Aleš<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Experimental Plant Biology, Charles University in Prague, Vinicna 5, Prague, Czech Republic*

\*For correspondence. E-mail: asoukup@natur.cuni.cz

### **Corresponding author:**

Soukup Aleš  
Department of Experimental Plant Biology  
Faculty of Science  
Charles University in Prague  
Viničná 5  
128 44 Prague 2  
Czech Republic  
e-mail asoukup@natur.cuni.cz  
tel. +420 22195 1679  
fax +420 22195 1704

### **Abstract**

Permeability tests using apoplastic tracers are efficient tools for tracing the apoplast route in plant root tissues. They enable localization of sites where apoplast is permeable to solutes from surrounding and evaluation the local variation in permeability. Although the tracers are used for many decades, there is still not an ideal tracer and flawless procedure. All of them have different characteristics and limitations. Behavior and gained results of each tracer depend strongly on many parameters – on plant species, character of cell walls, concentration of tracer, exposure time, subsequent processing and chemical properties of selected tracer. In this review we summarize usage and our experience with the most frequently used tracers representing various groups with different characteristics.

**Key words:** apoplastic tracer, permeability, ferrous ions, berberine, PAS reaction, PTS, exodermis

## **Introduction**

Plant is an open system, with ongoing communication with its soil environment, including e.g. water and nutrient uptake but also adverse influence of rhizosphere. According to the pathway of flow the transport space is traditionally and functionally divided to apoplastic and symplastic (Münch, 1930). Symplastic continuum is surrounded by plasma membrane, which serves as a selective barrier securing active regulation and selection of compounds passing to and from the protoplast. Apoplast on the other hand is an extraprotoplasmic space comprising volume of cell walls and intercellular spaces.

In order to keep some degree of selective transport between root and surrounding environment the passive and mostly non-selective transport via apoplast is restricted in specific tissues acting as apoplastic barriers. Generally present apoplastic barrier in roots of vascular plants is endodermis. Its function is related to the modifications of anticlinal cell walls and tight association with the plasma membrane (Alassimone et al. 2012; Enstone et al. 2003; Ferguson and Clarkson 1976; Geldner 2013; Rufz de Lavison 1910), so that transport is restricted mostly to symplast. Similar type of apoplastic barrier may be differentiated in the peripheral part of the root cortex - exodermis, which occurs in the roots of most seed plants (Perumalla et al. 1990b; Peterson and Perumalla 1990). Of course the term apoplastic barrier should not be considered strictly as impermeable boundary to any compound but is molecule size and charge related (Hose et al. 2001) and its properties might change under influence of environment (Colmer 2003; Degenhardt and Gimmler 2000; Meyer et al. 2009; Moon et al. 1984). Permeability of root apoplast is modified via structural changes and/or impregnation of cell walls and is environmentally plastic in some species (Meyer et al. 2009; Schreiber et al. 1999; Zeier et al. 1999). Apoplastic barriers play crucial role in water and nutrient uptake, oxygen economy of wetland plants as well as other fields of stress ecophysiology (Armstrong et al. 2000; North and Nobel 1995; Redjala et al. 2011; Soukup et al. 2007).

In spite of the importance of root wall/apoplast permeability there is rather limited methodological set of tools to evaluate its extend and spatial variation. There are several attitudes to probe permeability and transport pathways across root. The first group might be presented by quantitative measurements of hydraulic and other transport parameters. For example root pressure probe technique (Bramley et al. 2007; Knipfer and Fricke 2010; Peterson et al. 1993; Ranathunge et al. 2003; Ranathunge et al. 2005a; Ranathunge et al. 2005b; Zimmermann and Steudle 1998) and vacuum perfusion technique (Knipfer and Fricke 2010). Those might quantify root pressure (Wegner 2014), water and solute flows for whole root systems or only excised parts of roots. Techniques following radial O<sub>2</sub> loss (ROL) use root-sleeving O<sub>2</sub> electrode or methylene blue indicator dye for detection O<sub>2</sub> escaped from the root, when not enough apoplastic barriers are created (Armstrong and Armstrong 2001; Shiono et al. 2011; Soukup et al. 2007). Proper usage of those methods provides physically robust quantitative data suitable for modeling of transport flows. On the other hand their spatial resolution is generally somehow limited in comparison with the other group of attitudes using apoplastic tracers.

Apoplastic tracers are compounds with limited penetration cross the plasmalemma. That is why it is considered that their transport is carried only via apoplast. As discussed latter on this prerequisite is not so strict for most of the compounds used. Root tissues exposed to solution containing such a tracer may in subsequent processing and localization provide positional information on accessible part of apoplast. The processing should be considered as an important step of the procedure affecting subsequent interpretations. There is significant informative value of such attitude but output should be interpreted very carefully. It should be stressed out that penetration of compounds via apoplast is strongly dependent on molecular size and charge; for further information see (Marschner 1995; Sattelmacher 2001). Apoplast might contain high density of negative charges which strongly affect probes, as e.g. PTS (for

details see next chapter) or ions of metals (Gierth et al. 1999; Zimmermann and Steudle 1998). In other words tracer can be related only to compounds of similar molecular properties. Attempts of their usage to trace water movement (Canny and Huang 1994; Varney et al. 1993; Zimmermann and Steudle 1998) or other compounds in apoplast should be interpreted very carefully and one should realize that movement of tracer might differ considerably from other compounds including water. Despite of such limitations there are still not many other options to substitute this valuable set of methods for localization of apoplastic barriers in roots and giving some idea of relative permeability of particular tissues with desired spatial resolution.

Tracers penetrating the root tissues might be detected on the sections, whole-mounts or quantified after tissue elution, e.g. fluorometrically (Faiyue et al. 2010) or their concentration in collected xylem sap is measured (Krishnamurthy et al. 2014). Further manipulation of the tissue, e.g. experimental cutting off selected laterals (Ranathunge and Schreiber 2011) or controlled damage of particular surface layers (Moon et al. 1984) might help further specify features and position of apoplastic barriers.

To our knowledge the very first reference using apoplastic tracers to demonstrate varying permeability of root tissues is that of Ruz de Lavison (1910). He used iron applying to the root from surrounding solution. His identification of “living membranes” bordering the inner space of central cylinder from passive diffusion of compounds from surrounding solution was crucial step in root biology. Ferrous ions are still used as apoplastic tracer. For accelerating of the precipitation, oxidizing compounds are added to the ferrous ions. In Fenton reaction hydrogen peroxide oxidizes  $\text{Fe}^{2+}$  to  $\text{Fe}^{3+}$ . Resulting precipitates of  $\text{Fe}^{3+}$  hydrates can be histochemically localized as insoluble pigment of Berlin Blue (also called Prussian Blue), ferric ferrocyanid  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ , which is formed when ferric ions react with hexaferrocyanate anions  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . White precipitates of  $\text{Fe}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  might be also produced during reaction (Pearse 1968). Alternatively,  $\text{CuSO}_4$  can be used and detected as

brown insoluble crystals of copper ferrocyanid  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , so called Hatchett's brown (Ranathunge et al. 2005a; Ranathunge et al. 2005b), but due to the similar shades of plant cell walls brown precipitates are worse to distinguish than blue color of ferric ions.

Up to now, there are various compounds used as an apoplastic tracer with different properties and limitations. Of course their usage is not limited to roots (Canny 1993b; Perumalla et al. 1990a). Beside ferrous ions (Rufz de Lavison 1910; Soukup et al. 2002) and  $\text{La}^{3+}$  (Lehmann et al. 2000), other cations are used for localization of uptake as e.g. radioactive strontium and  $^{32}\text{P}$  used for the tracing the calcium ions or phosphate, respectively (Ferguson and Clarkson 1975; Ferguson and Clarkson 1976) or e.g. rubidium used for tracing the potassium ions (Gierth et al. 1999). However, their transport across plasma membrane should be considered.

Only few apoplastic probes might be observed under bright field optics on fresh sections such as precipitate products of ferrous ions or periodic acid modified cell walls (Husakova et al. 2013; Soukup et al. 2002). PAS (Periodic acid – Schiff's reagent) reaction is general histochemical reaction used to demonstrate presence of structural polysaccharides. Inorganic periodic acid ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ , Mr 227.90) oxidatively cleaves carbon bonds between 1, 2-glycol groups of glucose (so called diols) contained in polysaccharides of cell walls. Dialdehydes produced by periodic acid in cell wall can be localized on sections (fresh or permanent) afterwards by Schiff's solution. Basic fuchsin solution is reduced by sulfite and form leucobase of Schiff's reagent to detect and stain dialdehydes intensively purple (Pearse 1968). Detail information about the detection of selected dyes and samples processing and options of their usage are discussed later.

Majority of tracers represent quite large organic molecules of dyes observed under epifluorescence microscope. To understand their behavior on their way through the apoplastic route, it is necessary to realize their properties, e.g. their size or charge of the molecule, since

dyes with negative charge will not bind to the commonly negatively charged cell wall material. With some generalization we can distinguish several groups of fluorescent tracers according to affinity to apoplastic cell wall components; below we present some of the most widely used. Propidium iodide (Mr 668.39) contains two quaternary ammonium cations which cause high affinity to the acidic compounds of the cell walls (Hosmani et al. 2013; Naseer et al. 2012). Cellufluor (Mr 916.98) binds tightly cellulosic and hemicellulosic components of the cell walls. It is used under variable names as e.g. Calcofluor white M2R, Fluorescent Brightener 28; or similar dyes such as Fluostain I (Mr 960.95), Tinopal CBS/Tinopal PRS (Mr 562.56), Uvitex CFX (Mr 813.00), (Barnabas 1996; Ochiai and Match 2002; Peterson et al. 1981a; Peterson et al. 1981b; Peterson et al. 1978) and many others. Cellufluor and dyes with similar properties have to be detected under UV, what is the main disadvantage of these tracers. Plants, especially commelinoid monocots, have very strong autofluorescence of cell walls. Strong background deteriorates signal legibility and detection specificity mainly under UV excitation. Berberine hemisulphate (Mr 336.37) is an alkaloid with high affinity to acidic compounds (e.g. polyphenolics), (Enstone and Peterson 1992; Meyer and Peterson 2011; Strugger 1939). Berberine yields bright fluorescence under UV or blue excitation. It was first used as an apoplastic tracer by Strugger (1939) in a form of a raw extract of *Chelidonium*. The solution of berberine is usually followed after precipitation with thiocyanate (Enstone and Peterson 1992). Weak acidic dye which does not bind to cell walls is sulphorhodamine G (Mr 552.59), (Canny and Huang 1994; Oparka 1991; Varney et al. 1993). With some restrictions Evans Blue, acidic dye primarily used for detection of dead cells, can be used as apoplastic tracer, but high diffusibility of signal complicates the handling (Gierth et al. 1999) making sectioning almost impossible. Lucifer yellow CH (Mr 457.20), (Bederska et al. 2012) and SITS (4-acetoamido-4-isothiocyanostilbene-2,2-disulphonic acid, Mr 498.46), (Skinner and Radin 1994) have very high purchase cost and very low



fluorescence, so they are used mainly for microinjection technique and rather as a symplastic tracer. The acidic dye, that does not bind to components of cell walls, is light green SF yellowish (Mr 749.89), (Epel and Bandurski 1990; López-Pérez et al. 2007) or PTS (used as trisodium and tetrasodium salts), which contains even four negative charges (Skinner and Radin 1994). PTS (trisodium 3-hydroxy-5,8,10-pyrenetrisulfonate, Mr 524.00), also called Pyranine or Solvent Green is strongly fluorescent probe detectable under UV (Canny 1993a; Zimmermann and Steudle 1998) and blue excitation (Faiyue et al. 2010). Weak signal could be distinguished under green excitation (see also Cholewa and Peterson (2001)) that is convenient because of lower autofluorescence background. Intensity of fluorescence depends also on degree of ionization of 8-hydroxyl groups, so pH also affects maximum of its fluorescence excitation and following emission (Faiyue et al. 2010). PTS as well as previously mentioned sulphorhodamine G are often applied into the root media and detected in the leaves, because of their fast movement in plant tissues (Peterson et al. 1981a). Other not so common dyes are used for tracing of apoplastic transport, e.g. conjugates of Dextran-Texas Red (Sivaguru et al. 2006). In following section we summarize usage and experience with some of above mentioned tracers, which were used in our work.

### **Plant treatment**

There are several ways how to expose plant roots to the solutions of tracers. Application the aqueous solution of the tracers to the whole root system of intact plants is used in this paper. Transpiration drives the tracer with the flux and diffusion into and through the plant, as was described with berberine (Aloni et al. 1998). However, tracers can also be applied to the root system without shoots or only to root segments. In this case the penetration is driven almost exclusively by diffusion. It should be realized that both those attitudes might significantly affect the pattern of gained results (Aloni et al. 1998). In the case of root

segments it is necessary to eliminate the ingress of tracer solution via wound sites. Sticky wax or wool grease (lanolin) were successfully used in our team to dip blotted cut ends of segments and seal them before tracer application (Soukup et al. 2002).

Representative tracers were selected and compared under identical conditions in subsequent text.

### **Material and methods of cultivation**

The seeds of *Zea mays* L., cv. Cefran were germinated on the moist filter paper in the dark at 27 °C for 4 days. The seeds of *Oryza sativa japonica*, var. Nipponbare were soaked for 24 hrs in tap water and then 1 week germinated in the water in the light at room temperature. Seedlings with approx. 2 cm primary root were transferred into 12 L containers and cultivated in growth chamber (16/8-hr photoperiod; 435 W.m<sup>-2</sup> PHAR; 22/18 °C day/night; relative humidity 50 - 75 %). The aerated hydroponics (dissolved oxygen saturation ≥ 50 %) contained quarter-strength Hoagland 3 solution (Hoagland and Amon 1950), supplemented with microelements [11,6 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,3 μM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,34 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,015 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0,12 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Arnon, 1938) and 5,1 μM Fe<sup>3+</sup> citrate (pH 5.3–5.5)]. Solution was changed weekly. The maize plants were harvested 16 days after germination and rice plants 46 days after germination. At least 3 sections from 3 plants in selected positions were analyzed. Sections were observed with an Olympus BX51 (Olympus Copr., Tokyo, Japan) microscope (UV Olympus U-MWU, U-MWB and u-MWG filter blocks) and documented with digital camera Apogee U4000 (Apogee Imaging Systems, Inc., Roseville, CA, USA).

### **Test based on PAS reaction**

In this method periodic acid is used as an apoplastic tracer. Method was used before to test continuity of vascular tissues of *Zea mays* (Mistríková and Kozinka 1989). We have adopted and modified the method to test permeability of root surface and underlying tissues (Soukup et al. 2007; Soukup et al. 2002).

Features that might advocate use of the method is relative small inorganic molecule of periodic acid. It is a weak acid (pKa 3.29) oxidatively modifying components of cell wall so that the trace is permanently marked does not diffuse and cannot be washed out during subsequent sample processing. The method can be used also for permanent sections including dehydration and embedding. In connection with no fading the procedure ensures precise localization. This method can be combined with other procedure as treatment of fixed material with mixture of Schiff's solution of propidium iodide following by clearing with chloral hydrate or iodide solution (Soukup & Tylová, 2014). This is suitable for small pieces of organs or small plants as *Arabidopsis* (Truernit et al. 2008).

#### Procedure:

1. The root system of whole plant was dipped into aqueous solution of periodic acid (0.1 %) for period of several minutes (10 or 30 min) up to several hours (1 or 4 hrs).
2. After proper wash in tap water the remnants of periodic acid can be eliminated by washing in reducing solution (the same duration as periodic acid). This step is optional, but can improve the preciseness of localization. If included the reaction should be abbreviated as PARS (Pearse 1968)
3. Fresh sections or permanent sections (after dehydration and embedding) were prepared from samples
4. Sections were treated with Schiff's solution for 20 min, then washed in SO<sub>2</sub> water twice for 10 min
5. Sections were mounted into glycerol with SO<sub>2</sub> water (1:1) and observed in bright field optics; proper controls without using of periodic acid were done

Solutions (Pearse 1968):

Reducing solution

Dissolve KI (1 g) and  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1 g) in 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Add 0,5 mL HCl (2 M). The solution can be used only for limited period (several weeks).

Schiff's reagent (after de Tomasi)

Bazic fuchsin (1 g) dissolve in boiling water (200 mL) and stir for 5 min. The solution cool down to 50 °C and filter. 20 mL of 1 M HCl add and after cooling to room temperature add 1 g of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . The solution let to stay in dark for 24 hrs. The active coals (2 g) put into the solution and shake well for several minutes and filter the solution. The resulting colorless Schiff's reagent should be stored in dark at 0 – 4 °C and warm before use.

$\text{SO}_2$  water

Mix together before use: HCl (1 M, 5 mL) +  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (10 % aq., 5 mL) +  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL)

Possible sources of flaws and additional information:

- In case of fixation of the material it should be taken into consideration that fixatives introducing aldehydes into the tissue should be avoided.
- Control sections of the root without periodic acid treatment should be included to confirm the origin of the aldehydes since presence of indigenous aldehydes in the tissue (e.g. those of lignin) might interfere with the test.
- Proper washing of sections out of the Schiff's solution in  $\text{SO}_2$  is crucial for precise localization. If traces of unbound Schiff's solution stay on sections the leucobase of fuchsin can be re-oxidized in air giving false response.

### **Test based on $\text{Fe}^{2+}$**

Plant material is treated with solution containing  $\text{Fe}^{2+}$  ions that are readily mobile and can penetrate the tissue.

Procedure:

1. Solution of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (25 mM) was applied to intact roots of whole plant for 30 or 60 min
2. Roots were transferred into the tap water and fresh sections were prepared
3. Sections were treated for 10 min in solution containing 0.5 % of HCl and 1 %  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ . This step can be skipped as ferrous ions precipitate in tissues also spontaneously. On the other hand the induction and acceleration of precipitation improve localization as well as response.
4. Treated sections were washed in distilled water, mounted into 65 % glycerol and observed in bright field; proper controls were done

Possible sources of flaws and additional information:

- Hydrogen peroxide can be applied after  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  treatment for accelerating of  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation and more precise detection afterwards.
- Contamination of sections by iron during sectioning and subsequent handling (tools, chemicals) may be often source of errors and misinterpretation.
- As Berlin Blue is not soluble in organic solvents it might be possible to dehydrate, embed and section the samples. On the other hand the precipitate is not strongly bound to cell wall and can be washed out during handling.
- The localization of ferric ions depends on properties of cell walls. Metachromatic staining with Toluidine Blue of *Phragmites* showed, that adsorption ferric ions to cell walls carrying negative surface charge seems to be important factor determining later detected distribution (Soukup et al. 2002). However, we did not see any differences between cell wall staining from different maize tissues (data not shown).

### **Berberine test**

This method was modified and introduced by Enstone and Peterson (1992). Berberine hemisulphate is after entrance into root precipitated with thiocyanate. Formation of fine, less soluble needle-like fluorescent crystals refined localization and mostly eliminated problems

with minimal adsorption of basic berberine to uncharged surfaces of mostly cellulosic cell walls and decreased washing of berberine out of blocks of tissues or sections.

Procedure:

1. Solution of berberine hemisulphate (0.05 % aq.) was applied to tested material for 30 or 60 min
2. Roots were rinsed in tap water and gently blotted
3. Roots were treated with solution of KSCN.5H<sub>2</sub>O (90 mM) for 30 or 60 min. The duration should be the same as treatment with berberine hemisulphate
4. Sections were cut instantly and mounted into KSCN.5H<sub>2</sub>O (90 mM) solution to keep crystals insoluble
5. Fluorescence of berberine was observed under UV or blue excitation; proper controls without using of berberine hemisulphate were done

Possible sources of flaws and additional information:

- Detected crystals of berberine thiocyanate should be maintained in thiocyanate solution to keep them insoluble. That is why this test is not suitable for permanent preparation.
- The control sections have to be included as background autofluorescence of tissue may be misinterpreted as a positive response. This is particularly important under blue excitation, because emission of berberine is not well distinguished from background autofluorescence (mainly in *Commelinoids*).

### **Test with PTS**

PTS is fast moving in non-impregnated cell walls. This is why the washing step is the crucial factor. We used three combinations according to different authors. It was 120 min of staining followed by 10 min of washing (Cholewa and Peterson 2001), 120 min of staining and 6 sec washing and 6,5 hrs + 10 sec washing (Peterson et al. 1981a). Unfortunately, no changes in distributions were detected, but strength of the signal was decreased with longer wash.

Procedure:

1. The roots of intact plants were immersed into PTS solution (0.1 % aq.)
2. Roots were gently washed with slowly running water for defined time
3. Parts of root were segmented and mounted immediately into 90 % glycerol
4. Sections were observe under fluorecence as soon as possible; proper controls were done

Possible sources of flaws and additional information:

- Because of easy movement, it is very hard to make sections without losing PTS staining.

Handling of PTS treated samples must be very fast.

- Different techniques were used to minimize washing of PTS by other authors, e.g. mounting into modeling clay or immersion oil (North and Nobel 1995; Peterson and Edgington 1975).

### **Comparison of different apoplastic tracers**

Selected tracers represent principal categories of commonly used probes with focus on their affinity to the plant cell walls and also represent small inorganic tracers as well as bigger organic ones.  $\text{Fe}^{2+}$  and periodic acid are small apoplastic tracers that can be detected under bright field.  $\text{Fe}^{2+}$  has some affinity to cell walls and periodic acid as anion even modifies cell walls. Berberine hemisulphate is larger polar molecule which does not have sufficient affinity to polysaccharidic cell wall components, but its thiocyanate precipitate crystals are better detected in the apoplast. PTS was included in the selection because of its high mobility and rapid movement in apoplast. Comparison of these tracers might illustrate their usage and differences in their properties. Used apoplastic tracers were applied on whole root system of maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) plants as aqueous solution for 30 or 60 min. For better evaluation of individual tracers and their behavior we will review variability of their penetration and compare gained information in different parts of root system of *Z. mays* and *O. sativa* with different root surface permeability.

## **Movement of tracers in fully differentiated parts of main root**

### **Detection surface layers permeability**

Model plants differ in properties of exodermal apoplastic barrier. *Zea mays* plants were grown in aerated hydroponic cultivation where uniform exodermis was fully developed along  $\frac{3}{4}$  length of main root (Fig. 1 A, B). Patterns of  $\text{Fe}^{2+}$ , periodic acid and berberine hemisulphate distribution were rather similar. Limited penetration might be expected for apoplastically moved tracers, but all of them pervaded exodermis and reached deeper cortical layers (Fig. 1 C - H). However, in case of berberine detection we could just observe staining of cell walls, but no precipitates. In *Oryza sativa*,  $\text{Fe}^{2+}$  and precipitated berberine after 60 min of incubation (Fig. 1 I, J) were kept out of the root (just in root epidermis), which forms constitutive and stronger exodermal barrier. These two probes also did not enter main roots in *Phragmites australis*, which creates more extensive barrier (Soukup et al. 2002) and for berberine did not in *Iris germanica* (Meyer et al. 2009).

Different pattern was recorded for periodic acid, which passed across *O. sativa* exodermis after 60 min, marked up to the half of its cortex (Fig. 1 K) and all root tissues were labeled during 4 hrs in the same concentration (data not shown). The toxic effect on cell membranes can be one of the reasons, because the periodic acid is an oxidative. Lower concentration (0.02 %) which is less harmful to the membranes was also tested. It failed to penetrate deeper into the cortex even in roots without differentiated exodermis and the prolonged period of incubation (up to 5 hrs) did not change the position of the tracer penetration borderline (data not shown). Therefore low concentration gradient, reduction and exhaustion of periodic acid on its way should also be considered. Interestingly the probe in higher concentration (0.1 %) as we used, stayed on the surface of *P. australis* even after 4 hrs while *Glyceria* sp., other wetland grass with conspicuous constitutive exodermis, let periodic acid partially through. These differences were related to exodermal properties and pattern of



suberin lamellae deposition (Soukup et al. 2007; Soukup et al. 2002). Also stronger exodermal barrier of these wetland species in comparison to *O. sativa* can cause protection of plasma membranes from the probe, which cannot destroy them. Periodic acid seems to be a valuable estimation of root surface permeability. However, because of high probability of destructive effect of periodic acid on the membranes, it must be stressed out that the conclusion about the observation of its apoplastic movement through the cortex must be formulated very carefully.

PTS, which is very mobile probe, should penetrate into the root similarly to previously described tracers. However, likewise to our treatment with  $\text{Fe}^{2+}$  and berberine in *O. sativa* roots, PTS was detected neither in cortex of primary roots in our plants nor in *A. cepa*, (Cholewa and Peterson 2001; Peterson and Edgington 1975) and agave (*Agave deserti*), (North and Nobel 1995) both with strong developed exodermis. In *Z. mays* PTS was detected in leaves, but in publication anatomical sections missing so it does not mean that PTS passed into the stele through the cortex (Peterson et al. 1981a; Zimmermann and Steudle 1998). PTS tracing on root sections turned to be rather difficult due to its high solubility in water and leaching during processing of sections. That is why publications normally do not show results on sections from older and thicker parts of root, where cells and intercellular spaces are very big. Strong autofluorescence background of commelinoid cell wall makes the usage of PTS even more complicated. This is reason why we think this tracer is inappropriate for testing surface permeability of differentiated part of roots. Its use in other publications is restricted mainly to root apex and discussed below.

### **Tracer movement in inner root tissues**

Differences in movement of variable apoplastic tracers were observed during their permeation within the root cortex of *Zea mays*.  $\text{Fe}^{2+}$ , precipitated berberine and periodic acid

moved with similar rate in *Z. mays* root tissues, however in case of berberine we could frequently observe only staining without precipitates in cell walls. Probes stained the first few outer cortical layers after 30 min (Fig. 1 C – E) and reached deeper layers with prolonged time of exposure (Fig. 1 F - H).  $\text{Fe}^{2+}$  seemed to be slightly faster and after 60 min reached deeper layers (about 2 - 3 layers more), (Fig. 1 F). Similar trend was recorded before for *Phragmites australis* (Soukup et al. 2002). The assumption about toxicity of  $\text{Fe}^{2+}$  was demonstrated in previous work (Ranathunge et al. 2005a; Rufz de Lavison 1910; Soukup et al. 2002). Application of ferrous ions followed by berberine in older part of *Iris germanica* main root can manifest this problem (Meyer et al. 2009). Berberine normally did not pass behind the multiple exodermal layers, but if berberine was applied after ferrous ions (60 min) it was detected under these layers. So generally, concentration of  $\text{FeSO}_4$  solution and time of application have to be chosen very carefully according to toxicity tests for particular plant material (Meyer et al. 2009; Ranathunge et al. 2005a).

Species specific tracer movement within “unmodified” cell walls was documented for berberine (Enstone and Peterson 1992). In *Pisum sativum* and *Vicia faba* roots, which do not possess the exodermis, it did not move fast and most of the precipitates were observed just in the surface area even after 60 min. Authors claim that presence of ferrulic acid and phenolic compounds in cortical cell walls bind berberine and restrict its further penetration (Wilson and Peterson 1983). Controlled damage of peripheral tissues of older part of primary root of species with exodermis also allowed precipitated berberine to move only several layers from the damage and did not reach endodermis after 60 min. The distance of movement through the parenchymatous tissues was longer in *Z. mays*, shorter in *Allium cepa* and *Helianthus annuus* (Enstone and Peterson 1992). So, the limited diffusion of tracers should be taken into account even in primary cell walls of cortical tissues. Variation might be related to differences in composition and thickness of cell walls and size of intercellulars. Noticeable differences were

recorded between dicots and monocots in permeability of precipitated berberine through the cortex (Aloni et al. 1998). We can only speculate whether washing can leach away the precipitates during sectioning of cells of variable size in older parts of root and bring significant differences as we could frequently observe staining, but no precipitates in cell walls (Fig. 1 D, G). Due to displacement of crystals during sectioning and other manipulation, the accuracy of localization is somehow lower in these parts in comparison to use of periodic acid or  $\text{Fe}^{2+}$ . Detection of berberine is also related to size of precipitates which depends on concentration and time of exposure (Enstone and Peterson 1992; Meyer et al. 2009). Berberine was also observed in protoplast after an extended time of treatment duration (Soukup et al. 2002) and also some of our results from cortical *Z. mays* cells support this phenomenon (see Fig. 3 L). However it has not necessary mean destroying of plasma membrane. Berberine seems to be substrate for MDR-type (multidrug-resistance protein) ABC (ATP-binding cassette) transporter on plasma membranes isolated from cells of *Coptis japonica*. Moreover, exogenously added berberine to the medium was actively taken up through the plasma membrane (Shitan et al. 2003). Also another plant alkaloids seem to be penetrating cations and substrates of an MDR pump as was described for bacterial membranes (Severina et al. 2001).

Central cylinder of maize contains polyaromatic substances that are also stained with used probes ( $\text{Fe}^{2+}$ , berberine and periodic acid) in some extent (Fig. 1 L - N). In our experience such response is usually dependent on developmental stadium of the root (mainly lignification). This false staining is created during handling with the sections so not all of the results of stained stele looked the same. The most common false staining in *Z. mays* roots occurs around the late metaxylem vessels, pericycle and sometimes even cells in endodermis. However it does not mean that the probe reached the endodermis from the surface, because these areas show staining without any tracer application (in negative control). No stained

tissues were found in *O. sativa* (Fig. 1 O, P), just in some small extent with periodic acid (Fig. 1 Q).

Tinopal CBS, cellufluor similar dye, also came through the cortex but like other tracers did not reach the endodermis in *Z. mays* and *V. faba* even after 24 hrs (Peterson et al. 1981a). Since this probe binds to cellulose very tightly, we could suppose its slower movement, but in *Pyrus malus* and *Pelargonium hortorum* roots without exodermal layers was detected next to the endodermis (Peterson et al. 1981b) and immediately after wounding of the *A. cepa* root reached cellufluor the stele (Moon et al. 1984). However, all results can be affected by problems with detection under UV because of strong autofluorescence of commelinoid monocots cell walls.

### **Behavior of tracers in root apices**

Although the apoplastic barriers are formed in some distance from the root tip, apical part in the vicinity of the meristem was described not to be completely permeable for the tracers (Enstone and Peterson 1992). It can be speculated of smaller intermicrofibrillar spaces within the cell walls, different composition of matrix polysaccharides contrary to the older parts or it can be affected by secretion of mucigel from the root cap (Enstone and Peterson 1992). The previous work on *Phragmites australis* showed different behavior of some tracers in apex. Depth of penetration depended on position relative to meristem, but generally  $\text{Fe}^{2+}$  ions were restricted to the surface layers (Soukup et al. 2002), contrarily periodic acid and precipitated berberine stained most of the cortex (unpublished results). None of these tracers reached stele when endodermis was differentiated.  $\text{Fe}^{2+}$  ions seem to be most restricted in the root apex in comparison to results from older root tissues (see previous chapter). We can speculate about strong affinity of the ions to the surface of root tips, e.g. to the pectins. This is consistent with results after application of  $\text{CuSO}_4$  in *Zea mays* apex (Ranathunge et al. 2005b)

and also with our observations of root cap *Z. mays* and *Oryza sativa*, where  $\text{Fe}^{2+}$  stained just surface, even after prolonged time (Fig. 2 A, B). No staining of stele in the real apex and root cap showed also *Iris germanica* (Meyer et al. 2009).

Similar pattern to *P. australis* showed periodic acid in *O. sativa* roots (Fig. 2 C), but after 4 hrs all tissues were strongly stained (Fig. 2 D), what can support our opinion about high possibility of membrane destruction, as we also described in previous section. So in short sum, concentration of periodic acid has to be chosen carefully as well as exposure time since too high concentration and long time can cause destruction of membranes and penetration into cells.

Another probes which showed very low permeability in the young parts are cellufluor like Tinopal CBS in *Z. mays* roots (Peterson et al. 1981a) and Light Green, that was applied into the apoplast in apex of *Z. mays* coleoptyle (Epel and Bandurski 1990).

On the contrary, the precipitates from berberine test were detected in all of root apex tissues of *Z. mays* (Fig. 2 E), (Enstone and Peterson 1992) and *O. sativa* (Fig. 2 F). The precipitates were well retained (contrary to the older parts of root) probably because of the smaller cells with less porous cell walls in the root tip. The same pattern of berberine was observed in *I. germanica* (Meyer et al. 2009), *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Allium cepa* (Enstone and Peterson 1992).

Surprisingly, highly mobile PTS probe did not move in apex (Peterson and Edgington 1975) even after longitudinal cutting the root *A. cepa* tip into two parts followed by staining (Cholewa and Peterson 2001). We also tried this probe but various combinations of exposure time and following washing in *Z. mays/O. sativa* had no effect on the result. PTS was obviously washed out very rapidly so we could not properly distinguish between stained tissues and background (data not shown). Contrarily to that, in agave (*Agave deserti*) roots non-stressed with drought authors could observe PTS staining of whole apices, obviously

because of mounting sections into immersion oil (North and Nobel 1995). Also staining of whole apex of *A. cepa* without root cap was recorded by Peterson and Edgington (1975), unfortunately it is not possible to recognize more detail pattern on cited figures. However, in closer view, PTS was in patches contained in the protoplast of permeated tissues (Cholewa and Peterson 2001) and also we could sometimes observe some “shining” cortical *Z. mays* cells (see Fig. 3 M). The presence in protoplast might be connected with some degree of leakage, which might be related to unspecific uptake most likely via endocytosis (Cholewa and Peterson 2001). This behavior of PTS should be considered during interpretation. In fact the endocytotic activity might be presupposed to be responsible for differences in staining.

#### **Apoplastic tracers in the lateral roots**

Lateral roots usually emerge in differentiated tissues. All of used tracers did not reach non-emerged primordia (data not shown), although in radial direction exodermis does not contain suberin lamellae above the endogenously developed lateral root primordia (Armstrong et al. 2000; Enstone and Peterson 2005). Prolonged time had no effect on the results.

Just before emergence root caps of *Zea mays* (Fig. 3 A) and *Oryza sativa* primordia are well stained by ferric ions contrary to the main root tip. The same was monitored previously for  $\text{Fe}^{2+}$  in *Phragmites australis* (unpublished results). Periodic acid gives similar results in our material (Fig. 3 B) and also in *P. australis* (Soukup et al. 2002). Berberine penetrated the primordia faster, as it was found in the complete volume of non-emerged lateral roots primordia (Fig. 3 C).

In fully developed first (just few millimeters long) and second order lateral roots differences between used tracers were most pronounced. Ferric ions stained at first only the elongation part of the lateral root and whole root tip. Thin *Z. mays* roots were stained almost completely after 60 min (Fig. 3 D), the thicker one without root cap (Fig. 3 E). *O. sativa*

created generally thinner lateral roots than *Z. mays*, so all of them were fully stained (data not shown). Periodic acid stained very strongly whole short lateral roots of *Z. mays* and *O. sativa* already after 30 min (Fig. 3 F), however cross sections from very thick long *Z. mays* laterals showed just few layers staining (unpublished results). Precipitated berberine in *Z. mays* showed contrary pattern than previous described tracers. Thicker roots were intensely stained (Fig. 3 G), while thin roots (Fig. 3 H) often contained middle non-stained region (slightly observed also after using  $\text{Fe}^{2+}$ ). Reason can be caused by faster washing out/or maybe dissolving of tracer precipitates from these parts with bigger cells than in apices or places, where laterals are joined to main root. This reason is supported by our observation from thin lateral *Z. mays* roots stained just 10 minutes, where the staining was observed just in the junction lateral/primary root and in the root tip (data not shown). However, in *O. sativa* thinner roots berberine did not show such as pattern and whole lateral roots were stained, without lateral root cap (Fig. 3 I). Similar to berberine, also PTS seems to be washed out very easily and can be detect in places with smaller cells as on the base and in the lateral root tip of *Z. mays* (Fig. 3 K, L). The same stained area in the root tip were acquired for *O. sativa*. Also in laterals, PTS showed non-uniform and very patchiness staining in some cells, as possible result of endocytosis, what was already mentioned above (Fig. 1 S). Again results were hardly distinguishable from background. No PTS signal was recorded in central cylinder unlike Faiyue et al. (2010) who has observed that. So PTS seems to be more suitable for fast detection of the accumulation in leaves, passing the transpiration stream, but less for detection on the level of individual parts of roots.

## **Conclusion**

Despite the fact that methods presented here are not able to quantify the permeability or reflection coefficient of root-wall apoplast in physical terms they enable for localization of sites where apoplast is permeable to solutes from surrounding and evaluate the local variation, even though with considerable limitations. The advantage can be seen in using relatively small inorganic tracers ( $\text{Fe}^{2+}$ , periodic acid) that might mimic the soil solution solutes better than apoplastic organic tracers of high molecular weight.

Although the tracers are used for many decades, still does not exist ideal tracer and useful manual. Behavior and following results of each tracer depend very strongly on many incoming parameters. Our results and comparisons of results of many authors show that it depends on tested plant species – dicots/monocots and non/creating of constitutively developed exodermis. We must very carefully choose the concentration since can be toxic for the membrane. Also duration of exposure is important, because some tracers were observed in protoplasts after prolonged time. There are repetitions required to obtain unbiased data. It also depends on the selected tracer – not all are suitable for the same purposes due to their characteristics (e.g. cellufluor vs PTS). Also high background autofluorescence of cell walls, especially in grasses, may also cause some difficulties during detection of fluorescent tracers.

From above it might be concluded that mentioned “apoplastic” tracers could be used as an efficient tool for probing permeability of root tissues. However, those methods have many limitations. Only sensible and careful usage and relevant interpretation may yield trustworthy results.

## **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge support by project COST LD11017.



**Legends to figures:**

**Fig. 1. Cross sections of main roots in  $\frac{3}{4}$  of their length treated with variable apoplastic tracers.** (A) Fully differentiated Casparian strips in exodermis (ex) of *Zea mays* root detected with Berberine hemisulphate with Crystal Violet, UV. (B) Strong suberin lamellae in exodermis (ex) of *Z. mays* root stained with Sudan Red 7 B. (C, F, I, L, M)  $\text{Fe}^{2+}$  test. (D, G, J, N, O) Berberine test. (E, H, K, P, Q) PARS test. After 30 min passed all probes through the exodermis in *Z. mays* (C - E) and stained up to the half of cortex after 60 min (F - H). After 60 min in *Oryza sativa*,  $\text{Fe}^{2+}$  and berberine did not pass through the exodermis (I, J) by contrast with periodic acid (K). Arrows indicate the deepest layer, where the probe came. Central cylinder of *Z. mays*, 30 min of staining (L - N) and *O. sativa*, 60 min staining (P - Q). Proper controls were done. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2. Variable apoplastic tracers applied to main root apices.** Ferrous ions were detectable just on the surface of whole main root tip of *Zea mays* (A) and *Oryza sativa* (B) even after 60 min. Periodic acid reached some deeper tissues including whole root cap of *O. sativa* already after 30 min (C) and the roots were whole stained after 4 hrs (D). Precipitations of berberine are spread out everywhere in the root apex after 60 min in *Z. mays* (E) and *O. sativa* (F). Proper controls were done. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 3. Behavior of different apoplastic tracers in lateral roots.** During emergence of lateral roots of *Zea mays*, their root cap is stained after 60 min with  $\text{Fe}^{2+}$  (A) and periodic acid (B) but precipitated berberine entries into whole early stage of lateral root (C). Fully developed lateral roots (D – L). Thin second order lateral roots are whole stained with  $\text{Fe}^{2+}$  (D), while the root cap of first order laterals is unstained (E) in *Z. mays*. Periodic acid stained strongly whole *Z. mays* laterals both of orders already after 30 min; here second order lateral

(F). Precipitated berberine stained after 60 min whole thicker first order roots (G), while thinner second order roots (H) contained middle non-stained area in *Z. mays*. Thin *O. sativa* lateral roots of first order showed different pattern – after 60 min lateral roots were stained whole, instead of the root cap (I). In *Z. mays* we can detect PTS in the junction with first order lateral or on the few cells in the root tip of second order laterals (J, K). Precipitated berberine (10 min), (L) and PTS (M) was observed in protoplast of some cortical *Z. mays* cells of lateral roots. PTS was applied for 2 hrs and washed out during 6 sec. Proper controls were done. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$  (A – D, F – H), 100  $\mu\text{m}$  (E, I - ), 25  $\mu\text{m}$  (L, M).

Fig. 1

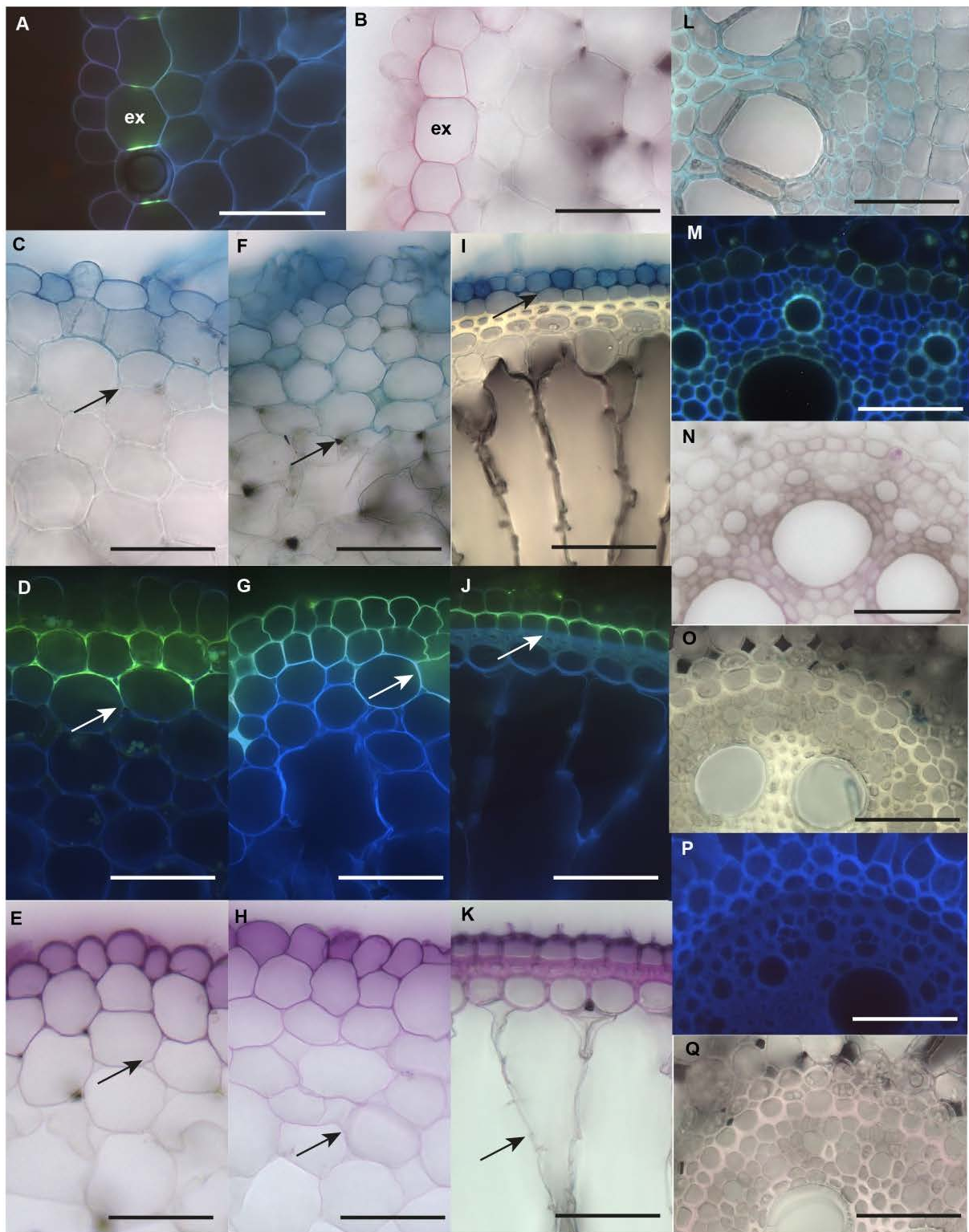


Fig. 2

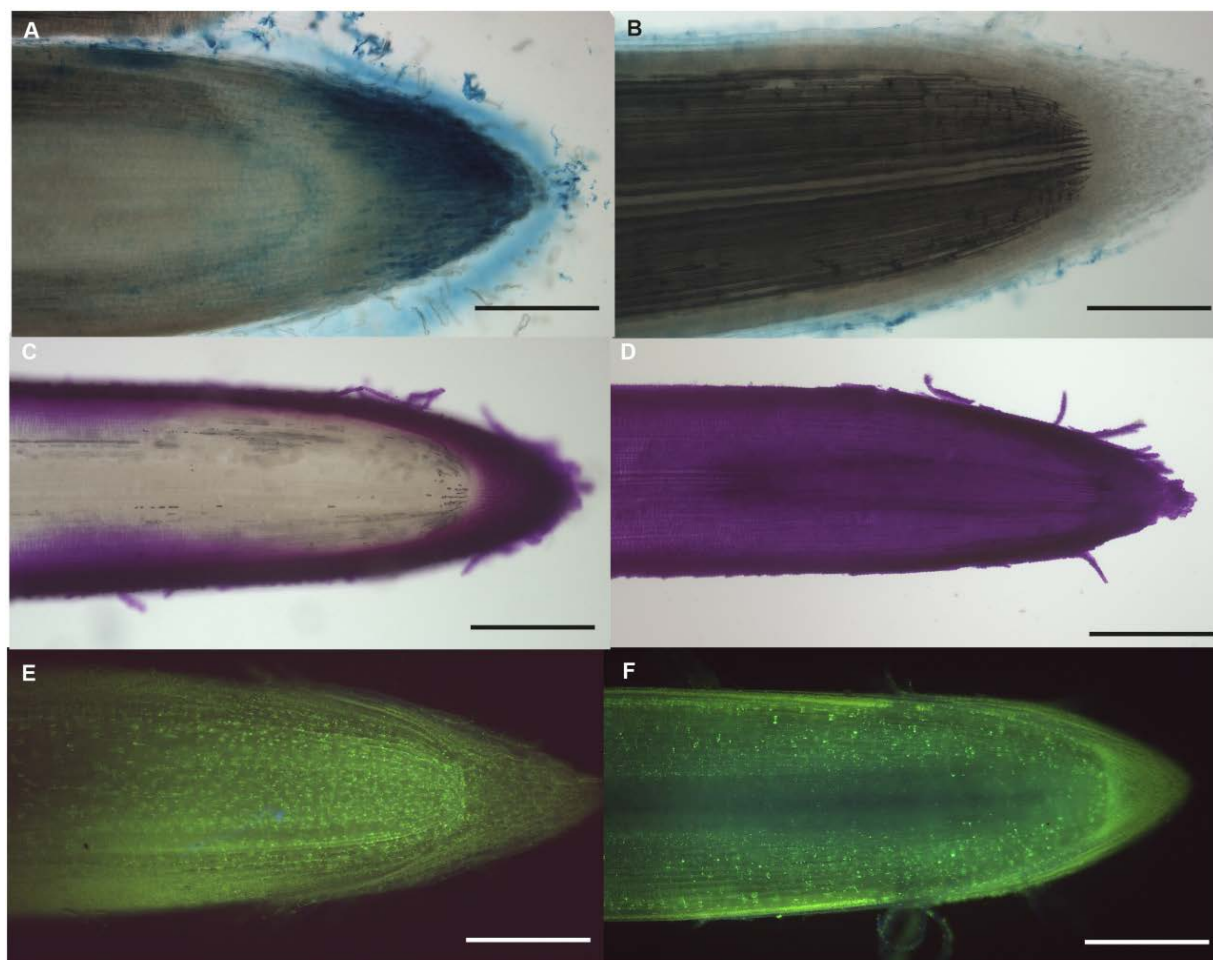
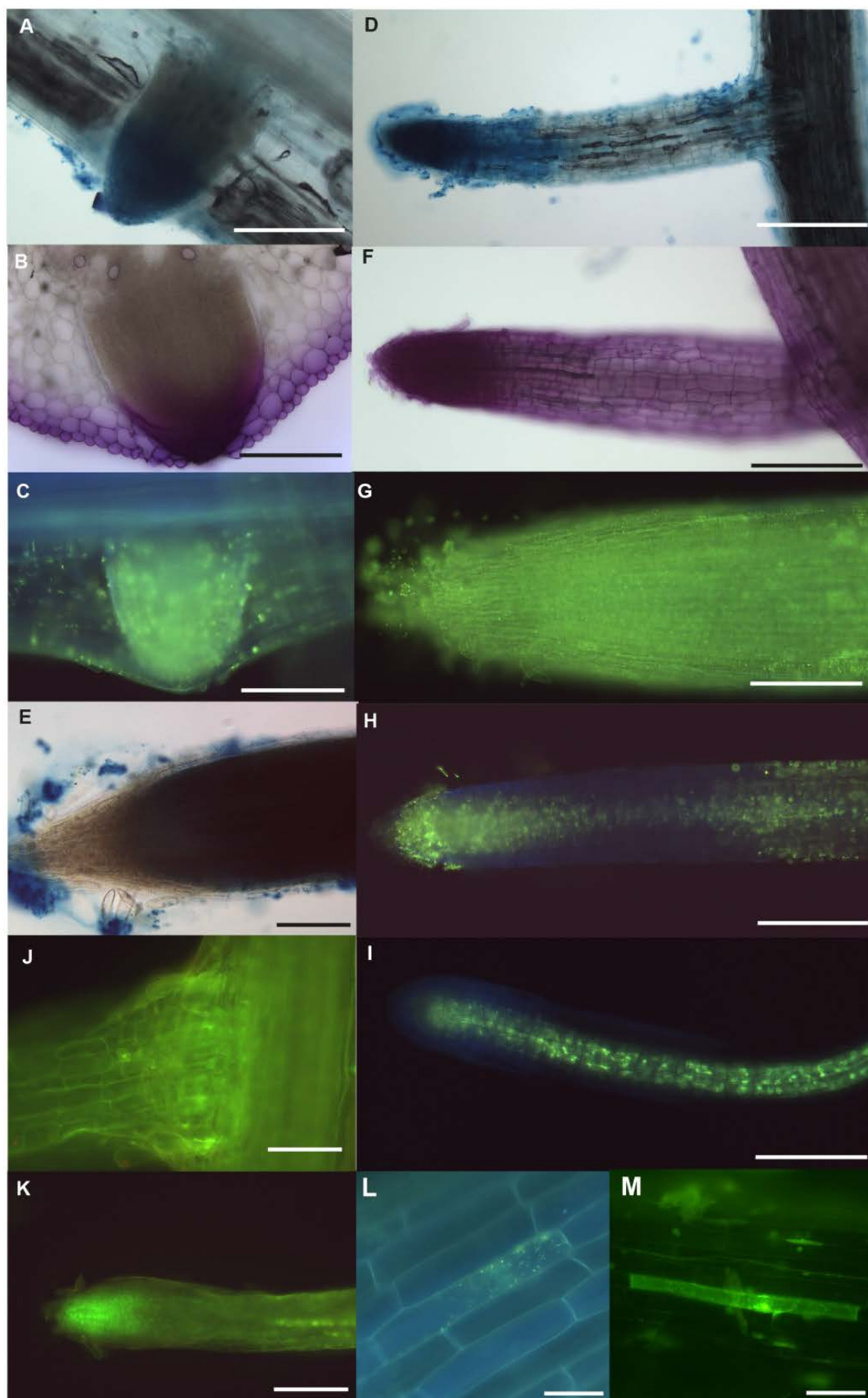


Fig. 3



## **References:**

- Alassimone J, Roppolo D, Geldner N, Vermeer JE (2012) The endodermis--development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma* 249: 433-443
- Aloni R, Enstone DE, Peterson CA (1998) Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species. *Planta* 207: 1-7
- Armstrong J, Armstrong W (2001) Rice and *Phragmites*: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *American Journal of Botany* 88: 1359-1370
- Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner DW, Beckett PM (2000) Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* 86: 687-703
- Barnabas AD (1996) Casparian band-like structures in the root hypodermis of some aquatic angiosperms. *Aquatic Botany* 55: 217-225
- Bederska M, Borucki W, Znojek E (2012) Movement of fluorescent dyes Lucifer Yellow (LYCH) and carboxyfluorescein (CF) in *Medicago truncatula* Gaertn. roots and root nodules. *Symbiosis*: 1-8
- Bramley H, Turner NC, Turner DW, Tyerman SD (2007) Comparison between gradient-dependent hydraulic conductivities of roots using the root pressure probe: the role of pressure propagations and implications for the relative roles of parallel radial pathways. *Plant, cell & environment* 30: 861-874
- Canny MJ (1993a) Transfusion Tissue of Pine Needles as a Site of Retrieval of Solutes from the Transpiration Stream. *New Phytologist* 123: 227-232
- Canny MJ (1993b) The transpiration stream in the leaf apoplast: water and solutes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 341: 87-100
- Canny MJ, Huang CX (1994) Rates of diffusion into roots of maize. *New phytologist* 126: 11-19
- Colmer TD (2003) Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment* 26: 17-36
- Degenhardt B, Gimmler H (2000) Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany* 51: 595-603
- Enstone DE, Peterson CA (1992) The apoplastic permeability of root apices. *Can J Bot* 70: 1502-1512
- Enstone DE, Peterson CA (2005) Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, Cell and Environment* 28: 444-455
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351
- Epel BL, Bandurski RS (1990) Apoplastic domains and sub-domains in the shoots of etiolated corn seedlings. *Physiologia plantarum* 79: 599-603
- Faiyue B, AL-AZZAWI MJ, Flowers TJ (2010) The role of lateral roots in bypass flow in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment* 33: 702-716
- Ferguson I, Clarkson D (1975) Ion transport and endodermal suberization in the roots of *Zea mays*. *New phytologist*: 69-79
- Ferguson IB, Clarkson DT (1976) Ion uptake in relation to the development of a root hypodermis. *New phytologist* 77: 11-14
- Geldner N (2013) Casparian strips. *Current Biology* 23: R1025-R1026
- Gierth M, Stelzer R, Lehmann H (1999) An analytical microscopical study on the role of the exodermis in apoplastic Rb<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) transport in barley roots. *Plant and soil* 207: 209-218

- Hoagland DR, Amon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347 of University of California, Agricultural Experimental Station Berkley
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* 52: 2245-2264
- Hosmani PS, Kamiya T, Danku J, Naseer S, Geldner N, Guerinot ML, Salt DE (2013) Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *PNAS* 110: 14498 - 14503
- Husakova E, Hochholdinger F, Soukup A (2013) Lateral root development in the maize (*Zea mays*) lateral rootless1 mutant. *Ann Bot* 112: 417-428
- Cholewa E, Peterson CA (2001) Detecting exodermal Casparian bands in vivo and fluid-phase endocytosis in onion (*Allium cepa* L.) roots. *Canadian Journal of Botany* 79: 30-37
- Knipfer T, Fricke W (2010) Root pressure and a solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist* 187: 159-170
- Krishnamurthy P, Jyothi-Prakash PA, Qin L, He J, Lin Q, Loh CS, Kumar PP (2014) Role of root hydrophobic barriers in salt exclusion of a mangrove plant *Avicennia officinalis*. *Plant, Cell & Environment*
- Lehmann H, Stelzer R, Holzamer S, Kunz U, Gierth M (2000) Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* 211: 816-822
- López-Pérez L, Fernández-García N, Olmos E, Carvajal M (2007) The phi thickening in roots of broccoli plants: An acclimation mechanism to salinity? *International Journal of Plant Sciences* 168: 1141-1149
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Limited, London
- Meyer CJ, Peterson CA (2011) Casparian bands occur in the periderm of *Pelargonium hortorum* stem and root. *Annals of Botany* x: x-x
- Meyer CJ, Seago Jr. JL, Peterson CA (2009) Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of Botany* 103: 687-702
- Mistríková I, Kozinka V (1989) Patterns of long-distance movement of water in roots. In: Loughman BC (ed) Structural and functional aspects of transport in roots. Kluwer Academic Publishers, pp 165-168
- Moon GJ, Peterson CA, Peterson RL (1984) Structural, chemical, and permeability changes following wounding in onion roots. *Can J Bot* 62: 7
- 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 of the United States of America* 109: 10101-10106
- North GB, Nobel PS (1995) Hydraulic conductivity of concentric root tissues of *Agave deserti* Engelm. under wet and drying conditions. *New Phytologist* 130: 47-57
- Ochiai K, Match T (2002) Characterization of the Na<sup>+</sup> delivery from roots to shoots in rice under saline stress: excessive salt enhances apoplastic transport in rice plants. *Soil science and plant nutrition* 48: 371-378
- Oparka KJ (1991) Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant cells. *Journal of Experimental Botany* 42: 565 - 579
- Pearse AG (1968) Histochemistry (Theoretical and Applied). J. and A. Churchill Ltd., London
- Perumalla CJ, Chmielewski JG, Peterson CA (1990a) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. III. Rhizomes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 127-132

- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE (1990b) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 93-112
- Peterson CA, Edgington LV (1975) Uptake of the systematic fungicide methyl 2-benzimidazolecarbamate and the fluorescent dye PTS by onion roots. *Phytopathology* 65: 1254-1259
- Peterson CA, Emanuel ME, Humphreys GB (1981a) Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Can J Bot* 59: 618-&
- Peterson CA, Emanuel ME, Weerdenburg CA (1981b) The permeability of phi thickenings in apple (*Pyrus malus*) and geranium (*Pelargonium hortorum*) roots to an apoplastic fluorescent dye tracer. *Can J Bot* 59: 1107-1110
- Peterson CA, Murrmann M, Steudle E (1993) Location of the major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta* 190: 10
- Peterson CA, Perumalla CJ (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 113-125
- Peterson CA, Peterson RL, Robards AW (1978) A correlated histochemical and ultrastructural study of the epidermis and hypodermis of onion roots. *Protoplasma* 96: 21
- Ranathunge K, Schreiber L (2011) Water and solute permeabilities of *Arabidopsis* roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *Journal of Experimental Botany* 62: 1961 - 1974
- 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
- Ranathunge K, Steudle E, Lafitte R (2005a) 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 (2005b) A new precipitation technique provides evidence for the permeability of Casparian bands to ions in young roots of corn (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment* 28: 1450-1462
- Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, Legué V, Lux A (2011) Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environmental and Experimental Botany* 71: 241-248
- Rufz de Lavison M (1910) Du mode de pénétration de quelques sels dans la plante vivante. Role de l'endoderme. *Revue Généralé De Botanique* 22: 15
- Sattelmacher B (2001) Tansley review no. 22 - The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 149: 167-192
- Severina II, Muntyan MS, Lewis K, Skulachev VP (2001) Transfer of cationic antibacterial agents berberine, palmatine, and benzalkonium through bimolecular planar phospholipid film and *Staphylococcus aureus* membrane. *IUBMB life* 52: 321-324
- Shiono K, Ogawa S, Yamazaki S, Isoda H, Fujimura T, Nakazono M, Colmer TD (2011) Contrasting dynamics of radial O<sub>2</sub>-loss barrier induction and aerenchyma formation in rice roots of two lengths. *Annals of Botany* 107: 10
- Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K (2003) Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 751-756
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* 50: 1267-1280



- Sivaguru M, Horst WJ, Eticha D, Matsumoto H (2006) Aluminum inhibits apoplastic flow of high-molecular weight solutes in root apices of *Zea mays* L. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169: 679-690
- Skinner RH, Radin JW (1994) The effect of phosphorus nutrition on water flow through the apoplastic bypass in cotton roots. *Journal of Experimental Botany* 45: 423 - 428
- Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubová O (2007) Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *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
- Strugger S (1939) Die lumineszenzmikroskopische analyse des transpirationsstromes in parenchyma. *Biol Zentralbl* 59: 14
- Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barthélémy J, Palauqui J-C (2008) High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 20: 1494-1503
- Varney GT, McCully ME, Canny MJ (1993) Sites of entry of water into the symplast of maize roots. *New phytologist* 125: 733-741
- Wegner LH (2014) Root pressure and beyond: energetically uphill water transport into xylem vessels? *Journal of experimental botany* 65: 381-393
- Wilson CA, Peterson CA (1983) Chemical composition of the epidermal, hypodermal, endodermal and intervening cortical cell walls of various plant roots. *Annals of Botany* 51: 759-769
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L (1999) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209: 1-12
- Zimmermann HM, Steudle E (1998) Apoplastic transport across young maize roots effect of the exodermis. *Planta* 206: 13

## **4. DISKUZE**

### **4.1 Vliv mutace genu LRT1 na vývoj postranních kořenů kukuřice (*Zea mays*)**

Hlavním cílem první části této dizertační práce byla detailní analýza kořenového systému mutanta *lrt1* kukuřice (*Z. mays*), u něhož byl popsán defekt v tvorbě postranních kořenů v časném postembryonálním vývoji (Hochholdinger and Feix 1998). Hned z počátku práce se ukázalo, že tato mutace neovlivňuje pouze vývoj postranních kořenů, avšak má vliv i na celkový habitus a prospívání rostlin, včetně jejich rozmnožování. Mutant vykazoval zvýšenou citlivost na různé podmínky prostředí. Vliv fosfátů a/nebo mykorhizy na částečné obnovení tvorby postranních kořenů byl popsán již dříve (Paszkowski and Boller 2002). Pro širší zhodnocení výsledků jsme proto zvolili různé kultivační podmínky a délku kultivace ve snaze vyhodnotit jejich vliv na vznik postranních kořenů. První známky vytvářejících se postranních kořenů v podobě makroskopicky pozorovatelných hrbolků na povrchu hlavních kořenů jsme pozorovali již necelý týden po vyklíčení u rostlin pěstovaných v hydroponii a o pár dní později i u semenáčků kultivovaných mezi listy vlhčeného filtračního papíru. Jejich pozdější prorůstání ale neprobíhalo srovnatelně s původním genotypem. Mutace tedy ovlivňuje spíše pozdější stádia vývoje postranních kořenů, než samotnou iniciaci, jak bylo původně předpokládáno bez bližšího anatomického prozkoumání (Hochholdinger and Feix 1998). Tomuto zjištění odpovídají i výsledky z kvantitativního hodnocení iniciačních událostí vyjádřené jako iniciační index (Dubrovsky et al. 2009), který zohledňuje kratší kortikální buňky u *lrt1*. V provzdušňované hydroponii vytvářely mutantní kořeny dokonce více primordií/postranních kořenů, než původní genotyp. Zdá se tedy, že ačkoliv je u mutanta nástup iniciace primordií časově zpožděn, později dochází k významnému urychlení jejich vývoje. To podporuje i kvantifikace jednotlivých stádií vývoje primordií v různých oblastech primárního kořene. Ve starší polovině hlavního kořene jsme mohli sledovat první stádia vývoje primordií mezi již plně prorostlými postranními kořeny. Vzhledem k obvyklému akropetálnímu vzorci iniciace, jež byl potvrzen u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), (Dubrovsky et al. 2006), to může být známkou výrazného zpomalení vývoje některých založených primordií. Z těchto uvedených důvodů nemůže být mutant nadále využíván ve studiích jako srovnávací kontrola nevytvářející postranní kořeny v časném postembryonálním vývoji (Hochholdinger et al. 2004a; Hochholdinger et al. 2001; Park et al. 2004). Za normálních podmínek jsou primordia vytvářena v určité minimální vzdálenosti

od sebe (Dubrovsky et al. 2006). V kořenech *lrt1* jsme však občas pozorovali utváření několika skupin buněk (zřejmě primordií) bez očekávaného rozestupu. Jde-li o chybu v regulaci distribuce jednotlivých iniciačních událostí (Laskowski et al. 1995; Sreevidya et al. 2010), nebo chybu v prostorové definici dělících se buněk samotného primordia (Shuai et al. 2002) nelze z našich experimentů vyvodit. Externí aplikace auxinu, který je těsně spjatý s tvorbou postranních kořenů (Swarup et al. 2008; Teale et al. 2005), nezvrátila tato postižení (Hochholdinger and Feix 1998). Podobně ani u vybraných komponent polárního auxinového transportu, včetně lokalizace přenašeče PIN 1 (PIN-FORMED 1), nebyly u *lrt1* zaznamenány změny (Schlicht et al. 2006).

Při vzniku primordia dochází k mnohačetnému organizovanému dělení zakladatelských buněk, které dávají vznik určitému tvaru primordií typickému pro daný druh rostliny (MacLeod and Thompson 1979; Malamy and Benfey 1997; Szymanowska-Pulka and Nakielski 2010). U primordií *lrt1* byly zaznamenány zajímavé a velmi výrazné změny v anatomii. Mutantní primordia vykazují poruchy v uspořádání jednotlivých vrstev, jsou širší na bázi a buňky základních pletiv jsou mnohem více vakuolizované. Často jsme pozorovali indukovanou lignifikaci na jejich bázi. Primordia mají silně ovlivněnou také strukturu vznikajícího apikálního meristému. Změny v jejich vývoji nejsou ovšem limitované jen co do struktury, ale také ve způsobu jejich prorůstání mateřskými pletivy. Zdáli jde o špatnou regulaci koordinace mezi primordiem a nad ním ležícími pletivy (Swarup et al. 2008) vedoucí k uvolnění střední lamely a separaci buněčných stěn během emergence primordia známé z huseníčku (*A. thaliana*), (Lucas et al. 2013; Péret et al. 2009; Roycewicz and Malamy 2014; Yue and Beeckman 2014), nebo o sekundární modifikace měnící mechanické vlastnosti pletiva, např. v důsledku tvorby rigidnější buněčné stěny, jak již bylo popsáno dříve u rýže (*Oryza sativa*), (Justin and Armstrong 1991), je z dostupných pozorování těžké hodnotit. Velmi záhy po vynoření z mateřských pletiv postranní kořeny ukončují svůj růst, díky časné ztrátě udržení aktivity apikálního meristému. Vzhledem k vysoké citlivosti mutanta k prostředí a tomu, že jsme toto chování pozorovali i u velmi mladých postranních kořenů, jde zřejmě o důsledek mechanického tlaku způsobeného horší průchodností mateřských pletiv. Změny v organizaci apikálního meristému z důvodu nepříznivých podmínek prostředí byly již popsány (De Tullio et al. 2010). Nelze však vyloučit ani možnost urychlení terminace apikálního meristému kvůli špatnému mechanismu koordinace dělení a dalšího vývoje vznikajícího apikálního meristému. Terminace byla popsána i jako normální součást vývoje u starších postranních kořenů kukuřice (*Z. mays*) a póru (*Allium porrum*) rostlých v půdě, kdy

v průběhu jejich vývoje dochází s časem k úplné diferenciaci všech buněk ve špičce postranních kořenů (Berta et al. 1990; Varney and McCully 1991). Jen malé procento z postranních kořenů prorostlých na povrch mateřského kořene dorůstá délky více než milimetru a jejich morfologie je silně odlišná od původního genotypu. Jsou zakroucené, tlustší a zejména v povrchových a podpovrchových vrstvách můžeme pozorovat výrazné změny ve tvaru, velikosti a soudržnosti buněk.

## 4.2 Detekované změny v hlavních kořenech *lrt1*

Oproti postranním kořenům jsou hlavní kořeny *lrt1* mutací méně ovlivněny. Jejich celková délka je redukována a jsou obecně tlustší, v důsledku laterální expanze buněk primární kůry. Po anatomické stránce ukazují normální uspořádání apexu včetně fungujícího, typicky uzavřeného typu apikálního meristému (Clowes 1981). To by mohlo nasvědčovat rozdílnému řízení hlavního a postranních kořenů, které bylo indikováno již dříve u jiných kukuřičných mutantních linií (Hochholdinger et al. 2004c; Inukai et al. 2005). V určité vzdálenosti od špičky hlavního kořene jsme detekovali změny v dělení buněk ležících zejména v povrchových vrstvách. Nepravidelnosti byly patrné hlavně ve starších částech mateřského kořene, které se projevovaly jako narušení standardního uspořádání jednotlivých vrstev buněk. To může být způsobeno např. vyšší rigiditou buněčných stěn, které nedovolí buňkám v povrchových vrstvách kompenzovat objemový růst buněk ležících pod nimi, ale též může jít o změny v celkové soudržnosti buněk. To také může souviset s pozorovanou lignifikací v těchto místech. Co je však příčina a co následek? A jak s tím souvisí vyšší detekovaná aktivita peroxidázy v těchto místech u kořenů *lrt1*? Peroxidázy hrají klíčovou roli právě při lignifikaci, popř. suberinizaci, při propojování jednotlivých složek buněčných stěn a v metabolismu reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species), (Burr and Fry 2009). Nezpůsobuje právě ona zvýšená aktivita peroxidázy vyšší rigiditu buněčných stěn, a tudíž vyšší mechanický odpor pletiv s následným poškozením pletiv během expanzivního růstu buněk? Role zvýšené aktivity peroxidázy při poranění či poškození je známá (Almagro et al. 2009). To, zda jde skutečně o následek působení stresu (následek vyšší citlivosti mutantních rostlin na méně příznivé podmínky prostředí), nebo jsou právě zvýšená aktivita peroxidázy a popsané modifikace buněčných stěn zodpovědné za pozorovaná poškození, nelze v tuto chvíli zodpovědět. Nicméně je možné, že detekované změny v aktivitě peroxidázy mohou mít vliv na pozorované změny při prorůstání postranních kořenů z mateřských pletiv, jak je zmíněno výše v této kapitole, neboť ROS signalizace a specifická

aktivita peroxidázy jsou vyžadovány právě pro tento krok vývoje postranních kořenů (Manzano et al. 2014).

Kukuřice (*Zea mays*) je druh rostliny, u které se uvádí, že vytváří vnější apoplastickou bariéru zvanou exodermis po indukci vnějšími podmínkami (Enstone and Peterson 1997). V našich experimentech s *lrt1* docházelo k tvorbě této vrstvy v kultivaci mezi vlhčenými listy filtračního papíru. Tyto podmínky se zřejmě svými charakteristikami (dostatek kyslíku, možné lokální snížení vodního potenciálu, možné místní vyčerpání živin) podobají perlitu či půdě, jelikož v těchto substrátech rostliny kukuřice (*Z. mays*) vytvářely masivnější exodermis ve srovnání s hydroponií (viz kap. 4.5). Pozorované nepravidelnosti v organizaci povrchových vrstev měly negativní vliv na správnou organizaci Casparyho proužků v exodermis. O důležitosti uspořádání buněk a jejich vzájemného kontaktu v jednotlivých vrstvách primární kůry na správné uložení Casparyho proužků v endodermis pojednává práce Martinka et al. (2012). Ztráta kontinuity bariéry byla potvrzena testem propustnosti s kyselinou jodistou. V původním genotypu byla tato sonda zastavena na úrovni vytvořené exodermis. Naopak u *lrt1* prošla kyselina jodistá v některých místech za exodermální bariéru. Co však bylo zajímavé, zastavila se většinou na úrovni třetí, resp. čtvrté vrstvy primární kůry od povrchu. V hypoxické hydroponii, která u tohoto genotypu neindukovala vznik exodermální vrstvy, prošla sonda u původního genotypu až k endodermis. Avšak v *lrt1* ukázalo její pronikání téměř totožný vzorec jako v kořenech s vytvořenou bariérou – prošla jen několika vrstvami od povrchu kořene. Omezení pronikání testovacího roztoku odpovídá umístění pozorované indukované lignifikace/suberinizace. Můžeme se domnívat, že jde o odpověď kompenzující defekty v uspořádání povrchových vrstev pletiv a jejich funkce.

Proteomická analýza mutanta ukázala změny související s metabolismem fenolických látek a vyšší hladiny enzymů syntézy ligninu (Hochholdinger et al. 2004a). To může být spojené právě s odpovědí na stres, nebo s abnormální lignifikací pozorovanou v povrchových vrstvách kořene a také v pericyklu. Abychom zjistili, zda zvýšená syntéza ligninu je spojená s odpovědí na stres, nebo jde o celkovou změnu v metabolismu *lrt1*, provedli jsme kvantifikaci ligninu v různých částech odlišně starých rostlin *lrt1*. Nenašli jsme ale žádnou změnu v obsahu ligninu oproti původnímu genotypu. Na lignifikaci v *lrt1* tedy můžeme nahlížet spíše jako na lokální mechanismus odpovídající na porušení vnitřní homeostázy v důsledku jakési obranné reakce na možná méně příznivé podmínky prostředí.

### **4.3 Vývoj apoplastických bariér v rámci kořenového systému kukuřice (*Zea mays*) za různých podmínek prostředí**

Apoplastické bariéry - endodermis a exodermis, umožňují kontrolu příjmu látek z okolního prostředí do rostlin. Rozsah, v jakém se vytvářejí, je úzce spjat s působením podmínek prostředí. Zaměřili jsme se proto na vývoj apoplastických bariér kukuřice (*Z. mays*) za působení rozličných stresových faktorů. Oproti ostatním pracím naše studie udává první systematický popis variability tvorby těchto bariér v rámci celého kořenového systému a zahrnuje i morfologickou analýzu kořenového systému (pro více detailů viz kap. 3.2.2) s důrazem na detailní analýzu růstu postranních kořenů, jejich distribuci a větvení. Poskytujeme výsledky získané z kultivačních podmínek indukujících nejčastěji studované stresové faktory působící na rostliny, jakými jsou hydroponie se sníženou dostupností kyslíku, organické kyseliny v kombinaci s hypoxií, zasolení, různé koncentrace těžkých kovů, půda a s ní spojený možný vliv mechanické odolnosti substrátu, zaplavená půda indukující vliv hypoxie a perlit s pískem zaléváný pouze vodovodní vodou. Vzhledem k vysoké pórovitosti naposledy jmenovaného substrátu a jeho relativně rychlému vysychání můžeme uvažovat o nižším vodním potenciálu v porovnání s ostatními kultivacemi a případně o možné snížené dostupnosti určitých živin díky zálivce vodovodní vodou bez dalšího přídavku minerálních živin.

### **4.4 Rozdíly ve vývoji endodermis mezi hlavním a postranními kořeny; vliv podmínek prostředí**

Endodermis tvoří vnitřní apoplastickou bariéru na povrchu středního válce. Vytváří se konstitutivně ve všech kořenech semenných rostlin (Alassimone et al. 2012; Esau 1965) a jak dokazují naše výsledky, alespoň první fáze jejího vývoje, vytvoření Casparyho proužků, tvoří kontinuální vrstvu dokonce i ve velmi krátkých postranních kořenech druhého řádu, o nichž není v literatuře mnoho informací. Ve vývoji postranních kořenů se endodermální vrstva definuje v primordiích dorostlých k nejvrchnější vrstvě primární kůry, popř. až k rhizodermis (Malamy and Benfey 1997). Casparyho proužky dozrávají těsně před, nebo krátce po vynoření postranního kořene (v závislosti na rychlosti růstu primordia a na druhu) a tvoří kontinuum s endodermis rodičovského kořene (Bell and McCully 1970; Peterson and Lefcourt 1990). Jelikož jsme sledovali segmenty různě dlouhých a ne/větvených postranních kořenů odebraných jeden centimetr od jejich báze a ve třech čtvrtinách délky

primárního kořene, nelze zhodnotit průběh diferenciaci bariér podél osy kořenů. Na druhou stranu u těchto míst můžeme brát utvoření jejich bariéry víceméně v maximálním stupni diferenciaci (v kořenu dané velikosti, stáří a při konkrétních kultivačních podmínkách), což umožnilo lépe zmapovat variabilitu tvorby bariéry a jejího rozsahu pro různé typy kořenů v rámci kořenového systému. Nejvíce se primárním kořenům svými charakteristikami podobá tvorba endodermis v dlouhých větvených postranních kořenech, přesto však i v těch se vyskytuje méně uložené terciární buněčné stěny. Krátké postranní kořeny vytvářejí naopak Casparyho proužky vůči radiální stěně kratší a i další stádia vývoje jsou tvořena v menším rozsahu.

Při srovnání postupu diferenciaci endodermis mezi různými podmínkami prostředí jsme zjistili zajímavé a velmi výrazné rozdíly patrné zejména u krátkých nevětvených postranních kořenů. Obecně lze říci, že při hypoxii kořeny neutvářejí příliš silnou endodermální bariéru, což potvrzují i data Enstone and Peterson (2005). Naopak přítomnost toxických kovů, směs písku/perlitu a zasolení stimulují radiální šířku Casparyho proužků. Podobný trend byl popsán již dříve při zasolení u kukuřice (*Zea mays*), (Karahara et al. 2004) a rýže (*Oryza sativa*), (Krishnamurthy et al. 2009), působením kadmia (Lux et al. 2011) a při pěstování kukuřice (*Z. mays*) na strusce s vysokým obsahem soli a těžkých kovů (Degenhardt and Gimmler 2000). Vysoká koncentrace kadmia způsobovala změny v organizaci Casparyho proužků a podporovala masivní rozvoj třetího stádia vývoje bariéry. Zasolení, toxické kovy a směs písku/perlitu podporovaly i rozvoj suberinové lamely, což bylo patrné zejména u krátkých postranních kořenů. V primárních kořenech bylo toto popsáno např. u kukuřice (*Z. mays*) pěstované ve vermikulitu (Enstone and Peterson 2005) a u různých kultivarů rýže (*Oryza sp.*) rostlé v zasolené půdě či hydroponii se solí (Krishnamurthy et al. 2009). Z našich výsledků je ovšem patrné, že ovlivnění na úrovni primárních kořenů námi sledovaných kukuřic je méně výrazné. U jiných zástupců dvouděložných i jednoděložných druhů pěstovaných ve vermikulitu nebyla suberinová lamela v primárních kořenech vytvořená, avšak tato vývojová studie byla dělána na mladších rostlinách (Aloni et al. 1998). Za ostatních kultivačních podmínek se zejména v krátkých postranních kořenech suberinová lamela nevytvářela téměř vůbec. Z toho lze vyvodit, že tento typ kořenů reaguje nejcitlivěji na podmínky prostředí při utváření endodermis.

#### 4.5 Srovnání vývoje exodermis a její propustnosti v rámci kořenového systému; vliv kultivačních podmínek

Naše výsledky ukazují, že podobně jako u endodermis, i exodermální Casparyho proužky a suberinová lamela se vytvářejí v primárních i postranních kořenech, ačkoliv můžeme pozorovat zřetelný gradient v rozsahu odpovědi na podmínky prostředí. Obecně se v krátkých postranních kořenech tvoří v menší míře. Třetí stádium vývoje exodermis, uložení terciární buněčné stěny, jsme, podobně jako Enstone and Peterson (2005), nepozorovali u žádné z variant u žádného typu kořenů, ačkoliv silně sklerifikovaná a ve vnějších několika vrstvách lignifikovaná hypodermis se vytvářela u adventivních nodálních kořenů vyvíjejících se nad vodní hladinou/substrátem. Nejde však o typickou exodermis, jelikož nebyly detekovány ani Casparyho proužky, ani suberinové lamely. Tento vzorec vývoje byl okamžitě překlopen do diferenciaci klasické exodermis, jakmile kořen dosáhl vodní hladiny a vyvíjel se v roztoku. Vliv různých typů prostředí jsme mohli sledovat díky inducibilnímu charakteru exodermis, jaký má právě kukuřice (*Zea mays*). Opět, jako u endodermis, nejpodobněji hlavním kořenům reagovaly dlouhé větvené postranní kořeny a směrem ke krátkým nevětveným postranním kořenům docházelo k zeslabení diferenciaci exodermis. V kultivacích s pevným substrátem se vytvářely silné Casparyho proužky, a to i ve většině velmi krátkých postranních kořenů. Exodermis v těchto typech kořenů u kukuřic (*Z. mays*) a citrusů (*Citrus* sp.) rostoucích v půdě, byla zmíněna již dříve (Eissenstat and Achor 1999; Wang et al. 1995). Ačkoliv by bylo velmi zajímavé zjistit, jaký vliv má silně vyvinutá exodermis u krátkých postranních kořenů na jejich celkovou propustnost, bohužel takto rostlé kořeny lze jen velmi obtížně testovat tradičními postupy pomocí apoplastických sond. Při jejich separaci od substrátu hrozí reálné riziko poškození, zejména jemných postranních kořenů, a tudíž ovlivnění výsledků (Moon et al. 1986; Varney and McCully 1991). Výsledky ze zaplavené půdy u blatouchu (*Caltha palustris*) a leknínu (*Nymphaea odorata*), (Seago et al. 2000b) a u kukuřice (*Z. mays*) rostlé jednak v aeroponické kultivaci (Enstone and Peterson 1998; Redjala et al. 2011; Zimmermann et al. 2000), jednak mezi vlhčenými listy filtračního papíru (viz kap. 4.2), jež se obě svými vlastnostmi blíží kultivaci v pevném substrátu více než hydroponii, podporují důležitost exodermis také u primárního kořene v těchto podmínkách. Důvodem zesílené tvorby exodermis v pevných substrátech může být jejich pórovitý charakter, díky čemuž může kořen v určitých místech ztrácet kontakt s částicemi a tím docházet ke snížení přístupu vody a živin. Ta pak slouží jako bariéra proti ztrátám vody z kořene do půdy a v extrémních podmínkách sucha může přebírat i funkci



rhizodermis (Enstone et al. 2003). Ve všech typech hydroponické kultivace jsme nepozorovali téměř žádný vývoj Casparyho proužků, a to zejména u krátkých postranních kořenů. Zeslabený vývoj exodermis v hydroponii potvrzují i data získaná na primárních kořenech kukuřice (*Z. mays*) a kosatce (*Iris germanica*), (Enstone and Peterson 1998; Meyer et al. 2009; Zimmermann et al. 2000). Ve stagnantní hydroponii nebyly Casparyho proužky detekovatelné v téměř žádných hlavních kořenech, oproti zavzdušněným variantám však suberinová lamela byla těmito podmínkami značně stimulována. Zesílení exodermální bariéry a naopak snížení rozsahu endodermis v těchto podmínkách je zřejmě důsledkem snahy o udržení kyslíku uvnitř kořene a k usnadnění jeho průchodu do středního válce (Enstone and Peterson 2005). Redukované radiální ztráty kyslíku z kořene ve stagnantní kultivaci byly sledovány i u rýže (*Oryza sativa*), (Colmer et al. 1998). Salinita v hlavních kořenech bavlníku (*Gossypium hirsutum*), (Reinhardt and Rost 1995), rýže (*O. sativa*), (Krishnamurthy et al. 2009) či skočce (*Ricinus communis*), (Schreiber et al. 2007) stimulovala vývoj prvního i druhého vývojového stádia exodermis, naopak u kukuřice (*Z. mays*) takový efekt nevykazovala. Podobně jako u hlavních kořenů (Lux et al. 2011; Redjala et al. 2011), i u delších postranních kořenů kukuřice (*Z. mays*) nižší dávky toxických kovů zvyšovaly šířku Casparyho proužků v radiálním směru. Naše výsledky naznačují, že vývoj exodermis je možné chápat jako do určité míry nezávislé kroky, které se mohou ve svém projevu lišit podle podmínek prostředí.

Výsledky z testů propustnosti mezi jednotlivými typy kořenů ukázaly, že při měření reálné vzdálenosti pohybu apoplastické sondy jsou jen velmi malé rozdíly mezi jednotlivými typy kořenů. Poněkud propustnější jsou velmi krátké postranní kořeny prvního a druhého řádu. Vyšší propustnost apoplastu kratších postranních kořenů byla popsána i u rákosu (*Phragmites australis*) a rýže (*O. sativa*), (Faiyue et al. 2010; Soukup et al. 2002). Při vyjádření propustnosti jako podílu primární kůry „zasažené“ kyselinou jodistou se ukázaly mnohem vyšší rozdíly mezi jednotlivými typy kořenů, což však může přímo souviset s jejich tloušťkou. Některé práce ovšem ukazují, že vzdálenost, kterou musí soluty urazit primární kůrou, koreluje s radiální složkou hydraulického odporu při toku do kořene (Eissenstat and Achor 1999; Rieger and Litvin 1999), což je také nutné brát na vědomí při vyhodnocování výstupů těchto testů. O možnosti ovlivnění výsledků také použitou apoplastickou sondou viz kap. 3.3.

Jak bylo poukázáno u endodermis, také v povrchových vrstvách způsobovala vyšší dávka kadmia změny v uspořádání povrchových vrstev, včetně exodermis, a to zejména

v postranních kořenech, které byly tlustší, podobně jako v práci Maksimović et al. (2007). Ve střední primární kůře jsme detekovali silné depozice ligninu a extracelulární materiál v mezibuněčných prostorech, s narušením normální stavby exodermální vrstvy. Podobné změny byly pozorovány u rýže (*O. sativa*) a rákosu (*P. australis*) působením organických kyselin či sulfidů (Armstrong and Armstrong 2001; Armstrong and Armstrong 2005), v menším rozsahu také v naší experimentální variantě se zasolením a určitou podobnost můžeme nalézt i u mutanta *lrt1* popsaného v první části této dizertační práce (viz kap. 4.2). Zřejmě jde o obrannou reakci na narušení pletiv. Takto negativně ovlivněné postranní kořeny vykazovaly redukováný únik kyslíku (Armstrong and Armstrong 2001), tudíž jsme očekávali, že tyto obranné depozice budou zabraňovat penetraci sondy, jako tomu bylo pozorováno i u mutanta *lrt1*. Reálná vzdálenost pohybu sondy se však nelišila od jiných použitých stresorů neovlivňující tak markantně kořenová pletiva, avšak zřejmě díky tlustším kořenům se sonda nedostala tak hluboko do kořenů.

#### **4.6 Problémy s detekcí exodermálních Casparyho proužků v hypoxické kultivaci**

V kultivacích s nedostatkem kyslíku jsme často pozorovali silné suberinové lamely v exodermis hlavního a zejména pak postranních kořenů, avšak bez současné detekce Casparyho proužků. Výsledky získané z histochemické detekce ligninu pomocí berberin hemisulfátu a floroglucinolu jsme doplnili metodou transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Tato metoda byla použita v jiné práci u stejného rostlinného materiálu, kde autoři histochemicky také nedetekovali Casparyho proužky, ale díky TEM zaznamenali páskovou plazmolýzu v této vrstvě (Enstone and Peterson 1997), která vzniká pouze díky pevné asociaci plazmatické membrány k buněčné stěně v místě Casparyho proužků. Bohužel ve srovnání s endodermis, u exodermis jsme neviděli žádnou páskovou plazmolýzu, zřejmě díky rychlému uložení suberinové lamely, která ruší toto pevné spojení v radiálních stěnách (Enstone and Peterson 1997). Nebyli jsme ani schopni jasně detekovat typické elektrondenční proužky v oblasti modifikované radiální buněčné stěny, a to ani na stejných řezech, kde byly jasně viditelné endodermální Casparyho proužky a dokonce ani v kořenech, kde byly tyto struktury v exodermis jasně barvitelné berberinem, jako např. v kultivacích v pevných substrátech. Tato metoda se pro výzkum exodermálních Casparyho proužků nezdá příliš vhodná, neboť i jiní autoři měli problémy s jejich jasnou vizualizací (Clarkson et al. 1987; Eissenstat and Achor 1999; Lehmann et al. 2000; Ma and Peterson 2003). Proč jsme

nepozorovali ve stagnantní kultivaci po histochemické detekci Casparyho proužky, avšak při stejných podmínkách doplněných o organické kyseliny jsme mohli tyto struktury do určité míry pozorovat? Že by docházelo za různých podmínek do jisté míry k nezávislé regulaci vytváření Casparyho proužků a suberinových lamel? Problémy s detekcí Casparyho proužků mohou také souviset se změnou obsahu, popř. i způsobu depozice ligninu a suberinu v proužcích. Tuto myšlenku zmínili již autoři Ranathunge et al. (2005), kteří si všimli neobvykle vysoké propustnosti exodermálních Casparyho proužků u hydroponicky pěstované rýže (*Oryza sativa*). Polemizují, že to může být zapříčiněno rozdílným chemickým složením oproti jiným druhům rostlin. Jiné práce ukázaly, že při různých druzích stresů se nemusí měnit jen celkové množství alifatických a aromatických monomerů, nýbrž i jejich podíl (Schreiber et al. 1999; Zeier et al. 1999). Tato problematika nebyla dosud zcela vyřešena. Ačkoliv některé práce na endodermis huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) ukazují, že základní jednotkou Casparyho proužků je výhradně lignin, a suberin se do nich ukládá až později (Naseer et al. 2012), jiné tvrdí, že u mnoha druhů detekovali v exodermálních proužcích pouze suberin, k detekci však použili pouze histochemické barvení (Perumalla et al. 1990). Jiné práce po chemické kvantifikaci ukazují, že u různých druhů rostlin endodermální i exodermální proužky obsahují obě tyto složky (Schreiber et al. 1999; Zeier et al. 1999).

#### 4.7 Testy propustnosti

V předchozích kapitolách dizertační práce jsem testovala propustnost povrchových pletiv kukuřice (*Zea mays*) *lrt1* mutanta a původního genotypu B73 s/bez vytvořené exodermální vrstvy, a kultivaru Cefran pro zhodnocení vlivu podmínek prostředí v různých částech kořenového systému. V průběhu práce se ukázalo, že ačkoliv využívání apoplastických sond je široce využívaná technika, výsledky různých autorů jsou často velmi rozporuplné. Z tohoto důvodu vznikla tato část dizertační práce, která testuje a porovnává vybrané apoplastické sondy na dvou genotypech s odlišným typem tvorby exodermis - inducibilní bariérou u kukuřice (*Z. mays*), (Enstone and Peterson 1997) a konstitutivním vznikem u rýže (*Oryza sativa*), (Ranathunge et al. 2003). Vytipovali jsme čtyři nejčastěji používané sondy - železnaté kationty (Rufz de Lavison 1910), kyselinu jodistou (Soukup et al. 2002), srážený berberin (Enstone and Peterson 1992) a PTS (trisodium 3-hydroxy-5,8,10-pyrenetrisulfonát), (Zimmermann and Steudle 1998), lišící se svým nábojem, velikostí a z toho plynoucím chováním uvnitř pletiv a jejich následnou detekcí. Odlišné chování sond

jsme zaznamenali při průchodu exodermální bariérou, při pohybu v primární kůře a také v různě starých částech kořene.

#### 4.8 Propustnost exodermální bariéry

Ačkoliv název bariéra evokuje neprostupnou vrstvu bránící vstupu všech látek, apoplastickou bariéru je nutné brát spíše jako selektivní vrstvu propouštějící jen určité molekuly s ohledem na jejich charakter, zejména velikost a náboj (Hose et al. 2001). Na tuto vlastnost poukazují i naše výsledky. Apoplastické sondy (železnaté kationty, berberin i kyselina jodistá) prošly ve třech čtvrtinách hlavního kořene kukuřice (*Zea mays*) přes vytvořenou exodermis, což bylo pozorováno u berberinu již dříve (Enstone and Peterson 1998). Oproti tomu v rostlinách se silnější bariérou, jakou tvořila námi sledovaná rýže (*Oryza sativa*), ale i rákos (*Phragmites australis*) či kosatec (*Iris germanica*),  $\text{Fe}^{2+}$  (Soukup et al. 2002) nebo berberin (Meyer et al. 2009; Soukup et al. 2002) nedokázaly prostoupit přes tuto externí bariéru. Zajímavou situaci jsme pozorovali u kyseliny jodisté, která u kukuřice (*Z. mays*) i rýže (*O. sativa*) pěstované v provzdušňované hydroponii prošla skrz bariéru, avšak neprošla přes silnější exodermální bariéru vytvořenou u kukuřice (*Z. mays*) jiného genotypu pěstovaného mezi vlhčenými listy filtračního papíru (viz kap. 4.2). U této sondy jsme zjistili také velkou variabilitu v chování při užití různé koncentrace a délky aplikace v kořenech různých druhů. Jelikož po několika hodinách dokázala sonda projít skrz celý kořen rýže (*O. sativa*) a povahou je to silné oxidační činidlo, za úvahu stojí její toxický vliv na membrány buněk. Při pětinašobně slabší koncentraci se u kukuřice (*Z. mays*) nedostala dále než do pokožky, a to i v mladých částech kořene bez vytvořené exodermis (viz kap. 3.2.2), zřejmě z důvodu vyčerpání její koncentrace už na pokraji kořene. Nicméně se zdá, že jde o druhově specifickou záležitost, neboť tato sonda prošla ve vyšší koncentraci buď jen do rhizodermis (u rákosu, *P. australis*) nebo jen částečně za exodermis (u zblochanu, *Glyceria maxima*). Oba druhy jsou mokřadní s celkem silnou bariérou, avšak liší se v jejím složení (Soukup et al. 2007; Soukup et al. 2002). Je zřejmé, že z důvodu možného negativního vlivu na membrány je nutné být při formulování závěrů o rychlosti průchodu pletivy velmi opatrný. Nicméně pro posouzení propustnosti povrchových pletiv je tento nástroj dostatečný a v mnoha ohledech spolehlivější než „méně toxické“ alternativy. Proto jsme jej použili pro testování propustnosti v první a druhé části této práce. PTS se ukázalo velmi nevhodné pro detekci na řezech, bez jejichž využití však nelze zpracovávat silnější kořeny. Nese silný negativní náboj, díky němuž má velmi nízkou afinitu k buněčným stěnám.

To zřejmě způsobuje jeho rychlé vymývání při přípravě řezů ze starších částí kořene, kde buňky mají mezi sebou velké mezibuněčné prostory. Jeho následná detekce je díky silné autofluorescenci s překrývajícím se emisním spektrem buněčných stěn trav také obtížná. To jsou zřejmě důvody, proč v literatuře můžeme nalézt výsledky z řezů, které prezentují pronikání sondy do hlubších pletiv kořene, jen velmi ojediněle (Peterson et al. 1981).

#### 4.9 Porovnání pohybu jednotlivých apoplastických sond v primární kůře

U kukuřice (*Zea mays*) prošly  $\text{Fe}^{2+}$ , kyselina jodistá i berberin do vnitřních pletiv kořene, což nám umožnilo vzájemně porovnat rychlost jejich pohybu. Hloubka penetrace závisela na délce působení expozice, avšak rozdíl mezi sondami (zejména kyselinou jodistou a berberinem) byl po 30, popř. 60 minutách obdobný. Dokonce kyselina jodistá se pohybovala mezi jednotlivými typy a řády postranních kořenů podobnou rychlostí (viz kap. 4.5). Při bližším zkoumání se zdá, že  $\text{Fe}^{2+}$  dosáhly za stejnou dobu o něco hlubších vrstev. Tato sonda je v porovnání s ostatními nejmenší, lze tedy předpokládat, že by se měla pohybovat rychleji. Nicméně je možné, že působí v určité míře negativně na buněčné membrány. Možný toxický vliv  $\text{Fe}^{2+}$  byl diskutován již v předchozích pracích (Meyer et al. 2009; Ranathunge et al. 2005; Rufz de Lavison 1910; Soukup et al. 2002). Zajímavé výsledky ukázalo porovnání jedné sondy aplikované na různé rostlinné druhy (Enstone and Peterson 1992). U těchto druhů byla kontrolovaně poškozena exodermis, čímž se odstranilo „zdržení/zastavení“ při průchodu touto vrstvou (Enstone and Peterson 1992). Vysrážený berberin byl detekovaný nejhluběji v pletivech kukuřice (*Z.mays*), kratší vzdálenost od rhizodermis urazil u cibule (*Allium cepa*) a slunečnice (*Helianthus annuus*). U dvouděložného hrachu (*Pisum sativum*) a bobu (*Vicia faba*) se nedostal dokonce hlouběji než pár vrstev od povrchu, ačkoliv tyto druhy vůbec exodermis netvoří. Autoři toto chování vysvětlují přítomností fenolických látek v buněčných stěnách primární kůry, které na sebe navazují berberin a omezují jeho následný pohyb (Enstone and Peterson 1992; Wilson and Peterson 1983). Rozdíl v pronikání této sondy mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami byl také popsán u Aloni et al. (1998). Můžeme spekulovat o jiném charakteru buněčných stěn a velikosti mezibuněčných prostor. Ačkoliv byl pro lepší detekci berberin srážen, čímž mělo být dosaženo vytvoření sraženin lépe udržitelných v mezibuněčných prostorech, na řezech jsme jich příliš mnoho nepozorovali. Docházelo zřejmě k jejich vymytí při manipulaci s řezy, díky čemuž jsou závěry dosažené pomocí této sondy méně přesné. Občas jsme pozorovali berberin i v některých buňkách primární kůry kukuřice (*Z. mays*) a byl popsán i v buňkách rákosu (*Phragmites australis*),

(Soukup et al. 2002). Nemusí však jít o známku toxického vlivu na membrány, jaký hrozí u kyseliny jodisté a  $\text{Fe}^{2+}$ , neboť berberin je substrátem pro MDR (multidrug-resistance protein) membránové transportéry popsané u koptisu (*Coptis japonica*) a některých bakterií (Severina et al. 2001; Shitan et al. 2003). Jak lze vidět z předchozího textu, u všech použitých sond byla zaznamenána jejich přítomnost v protoplastu. Proto je nutné si uvědomit, že pojem „apoplastická sonda“ je poměrně relativní.

#### 4.10 Chování apoplastických sond ve špičkách hlavních kořenů

Apoplastické bariéry vznikají v určité vzdálenosti od meristému, většinou nejdříve endodermis a v určité vzdálenosti od ní exodermis. Tato vzdálenost je druhově specifická a mění se v závislosti na podmínkách prostředí a rychlosti růstu kořene (Enstone and Peterson 1992; Enstone and Peterson 1997; Ranathunge et al. 2003). Zóna kořenové špičky, která tuto bariéru zatím neobsahuje, však není propustná pro apoplastické sondy. Autoři spekulují o vlivu kompaktnějšího pletiva s malými mezibuněčnými prostory (Enstone and Peterson 1992) nebo můžeme uvažovat o vlivu mucigelu. Oproti starším částem kořene, kde pohyb  $\text{Fe}^{2+}$  byl oproti ostatním sondám rychlejší, ve špičkách hlavních kořenů námi sledované kukuřice (*Zea mays*) a rýže (*Oryza sativa*), ale také u kosatce (*Iris germanica*), (Meyer et al. 2009) a rákosu (*Phragmites australis*), (Soukup et al. 2002) se kationty nedostaly do vnitřních pletiv. Vzhledem k tomu, že kukuřice (*Z. mays*) sekretuje velké množství mucigelu buňkami kořenové čepičky, může vazba  $\text{Fe}^{2+}$  znesnadnit jejich vstup do apexu. To bylo zdokumentováno pro některé další kationty, např.  $\text{Cu}^{2+}$  (Morel et al. 1986). Ačkoliv PTS je v buněčných stěnách vysoce mobilní, v pletivech apexu cibule (*Allium cepa*) a kukuřice (*Z. mays*) moc detekovatelné nebylo (Cholewa and Peterson 2001; Peterson and Edgington 1975; Peterson et al. 1981). Je otázkou, zdali to bylo způsobené tím, že sonda do pletiv apexu vůbec nepronikla, nebo se pohybovala v těchto místech velmi pomalu, popř. došlo k jejímu rychlému vymytí. Naopak u agáve (*Agave deserti*) barvilo PTS celé špičky (North and Nobel 1995). Bohužel tato pozorování nemůžeme doplnit výsledky z námi sledovaných druhů, neboť jak u apexu kukuřice (*Z. mays*), tak i rýže (*O. sativa*) jsme po přípravě řezů pozorovali velmi silné vymývání této sondy z pletiv a bylo velmi těžké rozeznat detekovaná místa od silně autofluorescentního pozadí. Navíc jsme pozorovali akumulaci této barvičky v protoplastu některých buněk mladých postranních kořenů kukuřice (*Z. mays*). Možnost vlivu nespecifické endocytosy je ukázána v práci Cholewa and Peterson (2001), kde byla tato sonda také endocytována v nehomogenně distribuovaných kortikálních buňkách mladých

částí kořene. Toto chování je nutné brát v potaz při postulování závěrů z detekce pomocí této sondy. Kyselina jodistá se u rýže (*O. sativa*) dostala částečně do apexu, podobně jako u rákosu (*P. australis*), (Soukup et al. 2002). Nicméně po čtyřnásobném prodloužení doby inkubace silně obarvila celý objem kořenové špičky. Tento výsledek podporuje naši domněnku o toxickém vlivu této sondy na membrány. V předchozí kapitole jsem zmínila, že na řezech starších částí kořenů se po detekci berberinem nenacházely téměř žádné jeho sraženiny. Oproti tomu ve špičkách jsme detekovali mnoho sraženin zachycených v celé špičce rýže (*O. sativa*) i kukuřice (*Z. mays*) a byli pozorovatelné i u hrachu (*Pisum sativum*), fazolu (*Vicia faba*), cibule (*A. cepa*), kosatce (*I. germanica*) a rákosu (*P. australis*), (Enstone and Peterson 1992; Meyer et al. 2009; Soukup et al. 2002). Důvodem, proč zde sraženiny byly zachovány, mohou být menší buňky s menšími mezibuněčnými prostory, ze kterých se hůře vymývají.

#### 4.11 Chování apoplastických sond v postranních kořenech

Barvitelnost primordií závisela na jejich poloze v mateřském pletivu a tedy i jejich stáří. Neprorostlá primordia kukuřice (*Zea mays*) a rýže (*Oryza sativa*) nebyla barvena žádnou z použitých sond. Situace se změnila, když primordium dosáhlo povrchových pletiv.  $\text{Fe}^{2+}$  a kyselina jodistá pronikly k primordiu a obarvily jeho apex a kořenovou čepičku, podobně jako u rákosu (*Phragmites australis*), (Soukup et al. 2002). Sraženiny berberinu byly detekovány v celém jeho objemu. Toto barvení není až tak překvapující, vzhledem k tomu, že nad prorůstajícími primordii se v exodermis neukládají suberinové lamely (Enstone and Peterson 2005). Proč však nebyly obarveny mladší, hlouběji se vyskytující primordia lze z našich pozorování těžko zodpovědět. Jelikož tato část zaměřená na postranní kořeny není příliš častým tématem v publikacích, nemáme mnoho srovnání s jinými autory oproti výsledkům z ostatních částí kořene. V prorostlých postranních kořenech jsme mohli pozorovat rozdílné chování jednotlivých sond. Je ale nutné si uvědomit, že tato pozorování jsou dělána na celých orgánech, kde hrozí překrytí a nedostatečné prostorové rozlišení signálu zejména v hlubších vrstvách. Zdá se, že barvení pomocí  $\text{Fe}^{2+}$  závisí na tloušťce postranních kořenů. U tenčích kořenů druhého řádu kukuřice (*Z. mays*) a prvního i druhého řádu u rýže (*O. sativa*), která vytváří obecně tenčí postranní kořeny, byly  $\text{Fe}^{2+}$  pozorované v celém objemu kořenů. Co však bylo velmi zajímavé, u tlustších kořenů kukuřice (*Z. mays*) nebyly zbarvené kořenové čepičky. Že by se tlustší kořeny svým charakterem, např. produkcí mucigelu, přibližovaly hlavním kořenům? Kyselina jodistá barvila tenčí kořeny obou řádů

kukuřice (*Z. mays*) i rýže (*O. sativa*) celé. Na příčných řezech jsme viděli, že tato sonda pronikla u tenkých kořenů k endodermis, v některých případech barvila i celý střední válec, naopak u dlouhých větvených kořenů kukuřice (*Z. mays*) se dostala jen do několika vrchních vrstev. Důležitou roli zde hraje tloušťka kořene, neboť bylo zjištěno, že roztok urazil podobnou reálnou vzdálenost (viz kap. 3.2.2). Zajímavé výsledky ukázaly berberin a PTS. Silnější kořeny kukuřice (*Z. mays*) se zdají být berberinem zbarvené celé, což bylo potvrzeno na příčných řezech (Aloni et al. 1998). Oproti tomu v tenčích postranních kořenech kukuřice (*Z. mays*) prvního i druhého řádu se sonda nacházela zejména v apexu a v místech napojení na hlavní kořen (totéž i u PTS). Naopak za špičkou barvení nebylo příliš znatelné. Toto nerovnoměrné barvení může být způsobeno rychlejším vymytím z oblastí s většími buňkami, popř. rychlejším rozpuštěním sraženin v případě berberinu. To naznačují i naše pozorování z detekce tenkých kořenů kukuřice (*Z. mays*) barvených pouhých 10 minut pomocí berberinu, kdy barvička byla viditelná pouze ve špičce a na bázi postranních kořenů. Nicméně v postranních kořenech slunečnice (*Helianthus annuus*) byly krystaly viditelné v celé primární kůře již po pěti minutách (Aloni et al. 1998). U rýže (*O. sativa*) jsme nerovnoměrné rozložení berberinu také nezaznamenali - barvil se celý postranní kořen, vždy bez kořenové čepičky. Podobně jako v hlavních kořenech i zde jsme občas detekovali PTS uvnitř některých buněk zřejmě důsledkem endocytózy zmíněné v předchozí kapitole a bylo velmi obtížné odlišit barvení od pozadí. To může být důvod, proč jsme oproti výsledkům Faiyue et al. (2010) nepozorovali žádný PTS signál ve středním válci.



## **5. ZÁVĚRY**

### **I. Analýza kořenového systému mutanta *lrt1* kukuřice (*Zea mays*)**

- Mutace ovlivňuje celkový habitus rostlin
- Tvorba primordií u *lrt1* silně závisí na podmínkách prostředí; iniciace je zpožděná, avšak frekvence iniciačních událostí může být v pozdějších stádiích dokonce vyšší než u původního genotypu
- Struktura primordií (včetně apikálního meristému), jejich způsob vnoření i pozdější vývoj postranních kořenů *lrt1* jsou silně narušené
- Hlavní kořeny vykazují poruchy v organizaci povrchových a podpovrchových vrstev pletiv
- V místech s disorganizací pletiv dochází k indukovaným lignifikacím, depozici polyfenolických látek, zvýšené aktivitě peroxidázy a ke změnám v průniku apoplastické sondy

### **II. Dokumentace struktury a funkce apoplastických bariér v rámci celého kořenového systému kukuřice (*Z. mays*) za různých podmínek prostředí**

- Mezi jednotlivými typy kořenů nejsou významné změny v utváření endodermis; naopak kultivační podmínky působí dosti výrazné odlišnosti, které ovlivňují nejvíce krátké nevětvené postranní kořeny
- Exodermis se tvoří ve všech typech kořenů a velice citlivě reaguje na různé podmínky prostředí; nejpodobněji hlavním kořenům reagují dlouhé větvené postranní kořeny
- Mezi jednotlivými typy kořenů nebyly nalezeny velké rozdíly v propustnosti; při srovnání jednotlivých podmínek prostředí byly zjištěny jen nepatrné rozdíly
- Různé podmínky prostředí měly silný vliv na celou architekturu kořenového systému

### **III. Porovnání nejčastěji využívaných apoplastických sond a jejich otestování na intaktních kořenech kukuřice (*Z. mays*) a rýže (*Oryza sativa*)**

- Byly vybráni čtyři zástupci apoplastických sond s různými vlastnostmi a otestování na dvou rostlinných druzích s různými charakteristikami propustnosti povrchových pletiv
- Výsledky byly porovnány s daty z literatury a případné rozdíly byly diskutovány
- Byly zhodnoceny rozdíly ve výsledcích z různých typů sond
- Byl zjištěn výrazný vliv vlastností použité sondy, její koncentrace, vliv rostlinného druhu, stáří materiálu a typu kořene

---

## **CONCLUSIONS**

### **I. Analysis of the root system of *lrt1* maize mutant (*Zea mays*)**

- The mutation affects the whole habitus of plants
- The *lrt1* primordia development depends very strongly on the environmental conditions; the initiation is delayed, but the frequency of initiation events may be even higher in the later stages than in the wild type
- The structure of primordia (including the apical meristem), their way of emergence and subsequent development of *lrt1* lateral roots is strongly affected
- The main roots show disturbances in organization of surface layers and layers under them
- Induced lignification, deposition of polyphenolic compounds, increased peroxidase activity and changes in penetration of apoplastic probes takes place in sites with observed disturbances

### **II. Documentation of the structure and function of apoplastic barriers in the whole root system of maize (*Z. mays*) under different cultivation conditions**

- Among the different types of roots are found no significant changes in the formation of the endodermis; on the contrary, culture conditions cause very substantial changes that affect mainly short unbranched lateral roots
- Exodermis creates in all types of roots and is very sensitive to different environmental conditions; the long branched lateral roots show the most similar behavior to the main roots
- No high differences in permeability of surface tissues were found among the different types of roots; only some differences were observed under different environmental conditions
- Different culture conditions had very strong effect on the architecture of the root system

### **III. The comparison of the most frequently used apoplastic tracers and their trying out on the intact maize (*Z. mays*) and rice (*Oryza sativa*) roots.**

- Four candidates of apoplastic tracers with different properties were selected and tested on two different plant species with different characteristics of surface layers

- The results were compared with data from the literature and any differences were discussed
- The differences of results from different kind of probes were evaluated
- We found out very significant effect of properties of the probe used, concentration, plant species, age and type of root

## **6. SEZNAM LITERATURY**

- Alassimone J, Naseer S, Geldner N (2010) A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (11):5214-5219
- Alassimone J, Roppolo D, Geldner N, Vermeer JE (2012) The endodermis-development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma* 249 (3):433-443
- Almagro L, Ros LVG, Belchi-Navarro S, Bru R, Barceló AR, Pedreño MA (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60 (2):377-390
- Aloni R, Enstone DE, Peterson CA (1998) Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species. *Planta* 207 (1):1-7
- Armstrong J, Afreen-Zobayed F, Blyth S, Armstrong W (1999) *Phragmites australis*: effects of shoot submergence on seedling growth and survival and radial oxygen loss from roots. *Aquatic Botany* 64:275-289
- Armstrong J, Armstrong W (2001) Rice and *Phragmites*: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *American Journal of Botany* 88 (8):1359-1370
- Armstrong J, Armstrong W (2005) Rice: sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe<sup>2+</sup> and water uptake, and lateral root emergence. *Annals of Botany* 96 (4):625-638
- Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner DW, Beckett PM (2000) Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* 86:687-703
- Arnon DI (1938) Microelements in culture-solution experiments with higher plants. *American Journal of Botany* 25:322-325
- Beeckman T, Burssens S, Inze D (2001) The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 52:403-411
- Begg CBM, Kirk GJD, Mackenzie AF, Neue HU (1994) Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. *New Phytologist* 128 (3):469-477
- Bell D, McCully ME (1970) A histological study of lateral root initiation in *Zea mays*. *Protoplasma* 70:179-205
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jurgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115 (5):591-602
- Berta G, Fusconi A, Trotta A, Scannerini S (1990) Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root system of *Allium porrum* L. *New Phytologist* 114 (2):207-215
- Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 29 (3):325-332
- Białek J, Potocka I, Szymanowska-Pułka JM (2014) Various scenarios of the cell pattern formation in *Arabidopsis* lateral root. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 83 (1):85-89
- Bonnett HT (1969) Cortical cell death during lateral root formation. *Journal of Cell Biology* 40:144-159
- Bonnett HTJ (1968) The root endodermis: fine structure and function. *The Journal of Cell Biology* 37 (1):199-205

- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7B or Fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* 66 (3):111-116
- Burr SJ, Fry SC (2009) Feruloylated arabinoxylans are oxidatively cross-linked by extracellular maize peroxidase but not by horseradish peroxidase. *Molecular Plant* 2 (5):883-892
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang HM, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8 (4):165-171
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inze D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13 (4):843-852
- Clarkson D, Robards A, Stephens J, Stark M (1987) Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots; development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant, Cell and Environment* 10 (1):83-93
- Clowes FAL (1981) The difference between open and closed meristems. *Annals of Botany* 48:761-767
- Colmer TD (2003) Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment* 26:17-36
- Colmer TD, Gibberd MR, Wiengweera A, Tinh TK (1998) The barrier to radial oxygen loss from roots of rice (*Oryza sativa* L.) is induced by growth in stagnant solution. *Journal of Experimental Botany* 49 (325):1431-1436
- Cosgrove DJ (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407 (6802):321-326
- De Smet I (2012) Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytologist* 193:867-873
- De Tullio MC, Jiang K, Feldman LJ (2010) Redox regulation of root apical meristem organization: connecting root development to its environment. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:328-336
- Degenhardt B, Gimmler H (2000) Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany* 51 (344):595-603
- Dubrovsky JG, Doerner PW, Colon-Carmona A, Rost TL (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1648-1657
- Dubrovsky JG, Gambetta GA, Hernández-Barrera A, Shishkova S, González I (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: Developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* 97:903-915
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (25):8790-8794
- Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucialy-Mendivil S, Jeknić Z, Ivanchenko MG (2009) The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* 103:807-817
- Eissenstat D, Achor D (1999) Anatomical characteristics of roots of citrus rootstocks that vary in specific root length. *New Phytologist* 141 (2):309-321
- Enstone DE, Peterson CA (1992) The apoplastic permeability of root apices. *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne De Botanique* 70 (7):1502-1512
- Enstone DE, Peterson CA (1997) Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis. *Canadian Journal of Botany* 75 (7):1188-1199
- Enstone DE, Peterson CA (1998) Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant, Cell and Environment* 21 (8):837-844

- Enstone DE, Peterson CA (2005) Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, Cell and Environment* 28:444-455
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21:335-351
- Esau K (1965) *Anatomy of seed plants*. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Faiyue B, Al-Azzawi MJ, Flowers TJ (2010) The role of lateral roots in bypass flow in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell and Environment* 33 (5):702-716
- Geldner N (2013) Endodermal specification. *Annual Review of Plant Biology* 64 (1):531-558
- Gierth M, Stelzer R, Lehmann H (1999) An analytical microscopical study on the role of the exodermis in apoplastic  $Rb^+$  ( $K^+$ ) transport in barley roots. *Plant and Soil* 207 (2):209-218
- Haas DL, Carothers ZB (1975) Some ultrastructural observations on endodermal cell development in *Zea mays* roots. *American Journal of Botany* 62 (4):336-348
- Hao ZB, Ichii M (1999) A mutant *RM109* of rice (*Oryza sativa* L.) exhibiting altered lateral root initiation and gravitropism. *Japanese Journal of Crop Science* 68 (2):245-252
- Hinchee MA, Rost TL (1986) The control of lateral root development in cultured *Pea* seedlings. I. The role of seedling organs and plant growth regulators. *Botanical Gazette* 147:137-147
- Hlavatá Z (1992) Vliv nedostatku kyslíku na kořenový systém kukuřice *Zea mays* L., Charles University, Prague
- Hoagland DR, Aronson DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347 of University of California, Agricultural Experimental Station Berkeley
- Hochholdinger F, Feix G (1998) Early post-embryonic root formation is specifically affected in the maize mutant *lrt1*. *The Plant Journal* 16 (2):247-255
- Hochholdinger F, Guo L, Schnable PS (2004a) Lateral roots affect the proteome of the primary root of maize (*Zea mays* L.). *Plant Molecular Biology* 56:397-412
- Hochholdinger F, Park WJ, Feix GH (2001) Cooperative action of *SLR1* and *SLR2* is required for lateral root-specific cell elongation in maize. *Plant Physiology* 125:1529-1539
- Hochholdinger F, Park WJ, Sauer M, Woll K (2004b) From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends in Plant Science* 9 (1):42-48
- Hochholdinger F, Woll K, Sauer M, Dembinsky D (2004c) Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Annals of Botany* 93:359-368
- Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6 (2):65-70
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* 52 (365):2245-2264
- Hotelling H (1931) The generalization of Student's ratio. *Annals of Mathematical Statistics* 2 (3):360-378
- Huang B, Eissenstat DM (2000) Linking hydraulic conductivity to anatomy in plants that vary in specific root length. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125 (2):260-264
- Husáková E (2006) *Regulace vývoje postranních kořenů*. Charles University, Prague
- Charlton WA (1991) Lateral root initiation. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant Roots: The Hidden Half*. Marcel Dekker edn., New York, pp 103-128
- Chhun T, Taketa S, Tsurumi S, Ichii M (2003a) The effects of auxin on lateral root initiation and root gravitropism in a lateral rootless mutant *Lrt1* of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* 39:161-170

- Chhun T, Taketa S, Tsurumi S, Ichii M (2003b) Interaction between two auxin-resistant mutants and their effects on lateral root formation in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 54 (393):2701-2708
- Cholewa E, Peterson CA (2001) Detecting exodermal Casparian bands in vivo and fluid-phase endocytosis in onion (*Allium cepa* L.) roots. *Canadian Journal of Botany* 79 (1):30-37
- Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2005) *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signalling. *The Plant Cell* 17:1387-1396
- Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55:335-347
- Jansen L, Roberts I, De Rycke R, Beeckman T (2012) Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367:1525-1533
- Jensen WA (1962) *Botanical histochemistry - principles and practice*. San Francisco
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York
- Justin SHFW, Armstrong W (1991) Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 118:49-62
- Karahara I, Ikeda A, Kondo T, Uetake Y (2004) Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219:41-47
- Krishnamurthy P, Ranathunge K, Franke R, Prakash HS, Schreiber L, Mathew MK (2009) The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 230:119-134
- Kroemer K (1903) Wurzelhaut, Hypodermis und Endodermis der Angiospermenwurzel. *Bibliotheca Botanica* 59:1-151
- Kumpf RP, Shi C-L, Larrieu A, Stø IM, Butenko MA, Péret B, Riiser ES, Bennett MJ, Aalen RB (2013) Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (13):5235-5240
- Laskowski M (2013) Lateral root initiation is a probabilistic event whose frequency is set by fluctuating levels of auxin response. *Journal of Experimental Botany* 64 (9):2609-2617
- Laskowski M, Biller S, Stanley K, Kajstura T, Prusty R (2006) Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiology* 47 (6):788-792
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum H, Sussex IM (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121:3303-3310
- Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L (2013) Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science* 18 (8):450-458
- Lehmann H, Stelzer R, Holzamer S, Kunz U, Gierth M (2000) Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* 211:816-822
- Lenochová Z (2004) Programovaná buněčná smrt v kořenech kukuřice seté *Zea mays* L. v průběhu vývoje aerenchymu. Charles University, Prague
- Lenochová Z, Soukup A, Votrubová O (2009) Aerenchyma formation in maize roots. *Biologia Plantarum* 53 (2):263-270

- Lichtenberková L (2002) Vývoj struktury kořene mokřadních rostlin. Charles University, Prague
- Lucas M, Kenobi K, Von Wangenheim D, Voß U, Swarup K, De Smet I, Van Damme D, Lawrence T, Péret B, Moscardi E (2013) Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (13):5229-5234
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* 62 (1):21-37
- Ma F, Peterson CA (2000) Plasmodesmata in onion (*Allium cepa* L.) roots: a study enabled by improved fixation and embedding techniques. *Protoplasma* 211:103-116
- Ma F, Peterson CA (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany* 81 (5):405-421
- MacLeod RD, Thompson A (1979) Development of lateral root primordia in *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*: rates of primordium formation and cell doubling times. *Annals of Botany* 44:435-449
- Maksimović I, Kastori R, Krstić L, Luković J (2007) Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. *Biologia Plantarum* 51 (3):589-592
- Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment* 28:67-77
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44
- Manzano C, Pallero M, Casimiro I, De Rybel B, Orman-Ligeza B, Van Isterdael G, Beeckman T, Draye X, Casero P, del Pozo JC (2014) The emerging role of ROS signalling during lateral root development. *Plant Physiology* 165 (4). doi:10.1104/pp.114.238873
- Marhavý P, Vanstraelen M, De Rybel B, Zhaojun D, Bennett MJ, Beeckman T, Benková E (2013) Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The European Molecular Biology Organization Journal* 32 (1):149-158
- Martinka M, Dolan L, Pernas M, Abe J, Lux A (2012) Endodermal cell-cell contact is required for the spatial control of Casparian band development in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 110 (2):361-371
- Meyer CJ, Peterson CA (2013) Structure and function of three suberized cell layers. In: Eshel A, Beeckman T (eds) *Plant Roots: The Hidden Half*. 4 edn., pp 1-20
- Meyer CJ, Seago Jr. JL, Peterson CA (2009) Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of Botany* 103:687-702
- Moon G, Clough B, Peterson C, Allaway W (1986) Apoplastic and symplastic pathways in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. roots revealed by fluorescent tracer dyes. *Functional Plant Biology* 13 (5):637-648
- Morel J, Mench M, Guckert A (1986) Measurement of  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* 2 (1):29-34
- 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 of the United States of America* 109 (25):10101-10106
- Němec B (1962) Botanická mikrotechnika. Nakladatelství československé akademie věd, Praha



- North GB, Nobel PS (1991) Changes in hydraulic conductivity and anatomy caused by drying and rewetting roots of *Agave deserti* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 78 (7):906-915
- North GB, Nobel PS (1995) Hydraulic conductivity of concentric root tissues of *Agave deserti* Engelm. under wet and drying conditions. *New Phytologist* 130 (1):47-57
- North GB, Nobel PS (1996) Radial hydraulic conductivity of individual root tissues of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as soil moisture varies. *Annals of Botany* 77 (2):133-142
- Park WJ, Hochholdinger F, Gierl A (2004) Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral- and crown root emergence in *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* 161:981-985
- Paszkowski U, Boller T (2002) The growth defect of *lrt1*, a maize mutant lacking lateral roots, can be complemented by symbiotic fungi or high phosphate nutrition. *Planta* 214:584-590
- Péret B, Larrieu A, Bennett MJ (2009) Lateral root emergence: a difficult birth. *Journal of Experimental Botany* 60 (13):3637-3643
- Peretto R, Favaron F, Bettini V, De Lorenzo G, Marini S, Alghisi P, Cervone F, Bonfante P (1992) Expression and localization of polygalacturonase during the outgrowth of lateral roots in *Allium porrum* L. *Planta* 188 (2):164-172
- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103 (2):93-112
- Peterson CA (1988) Exodermal Casparian bands: their significance for ion uptake by roots. *Physiologia Plantarum* 72 (1):204-208
- Peterson CA (1989) Significance of the exodermis in root function. In: Loughman BC (ed) *Structural and Functional Aspects of Transport in Roots*. Kluwer Academic Publishers, pp 35-40
- Peterson CA, Edgington LV (1975) Uptake of the systematic fungicide methyl 2-benzimidazolecarbamate and the fluorescent dye PTS by onion roots. *Phytopathology* 65:1254-1259
- Peterson CA, Emanuel ME, Humphreys GB (1981) Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Canadian Journal of Botany* 59 (5):618-625
- Peterson CA, Enstone DE (1996) Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiologia Plantarum* 97 (3):592-598
- Peterson CA, Lefcourt (1990) Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Canadian Journal of Botany* 68:2729-2735
- Peterson CA, Perumalla CJ (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103 (2):113-125
- Peterson RL (1979) Root buds in *Hieracium florentinum*: effects of nitrogen and observations on bud outgrowth. *Botanical Gazette* 140 (4):407-413
- Ploshchinskaya ME, Ivanov VB, Salmin SA, Bystrova EI (2002) Analysis of possible mechanisms of regulation of root branching. *Journal of General Biology* [in Russian] 63 (1):68-74
- 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 (2):193-205

- 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 and Environment* 28 (2):121-133
- Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, Legué V, Lux A (2011) Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environmental and Experimental Botany* 71:241-248
- Reinhardt DH, Rost TL (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany* 35 (4):563-574
- Rieger M, Litvin P (1999) Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy. *Journal of Experimental Botany* 50 (331):201-209
- Rich SM, Watt M (2013) Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *Journal of Experimental Botany* 64 (5):1193-1208
- Roycewicz PS, Malamy JE (2014) Cell wall properties play an important role in the emergence of lateral root primordia from the parent root. *Journal of Experimental Botany* 65 (8):2057-2069
- Rufz de Lavison M (1910) Du mode de pénétration de quelques sels dans la plante vivante. Role de l'endoderme. *Revue Généralé De Botanique* [in French] 22:225-240
- Seago JL, Peterson CA, Enstone DE (1999a) Cortical ontogeny in roots of the aquatic plant, *Hydrocharis morsus-ranae* L. *Canadian Journal of Botany* 77 (1):113-121
- Seago JL, Peterson CA, Enstone DE (1999b) Development of the endodermis and hypodermis of *Typha glauca* Godr. and *Typha angustifolia* L. roots. *Canadian Journal of Botany* 77 (1):122-134
- Seago JL, Peterson CA, Enstone DE (2000a) Cortical development in roots of the aquatic plant *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *American Journal of Botany* 87 (8):1116-1127
- Seago JL, Peterson CA, Kinsley LJ, Broderick J (2000b) Development and structure of the root cortex in *Caltha palustris* L. and *Nymphaea odorata* Ait. *Annals of Botany* 86:631-640
- Severina II, Muntyan MS, Lewis K, Skulachev VP (2001) Transfer of cationic antibacterial agents berberine, palmatine, and benzalkonium through bimolecular planar phospholipid film and *Staphylococcus aureus* membrane. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 52 (6):321-324
- Shen J, Xu G, Zheng HQ (2014) Apoplastic barrier development and water transport in *Zea mays* seedling roots under salt and osmotic stresses. *Protoplasma*:1-8. doi:10.1007/s00709-014-0669-1
- Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K (2003) Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2):751-756
- Shuai B, Reynaga-Peña CG, Springer PS (2002) The *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiology* 129:747-761
- Schlicht M, Strnad M, Scanlon MJ, Mancuso S, Hochholdinger F, Palme K, Volkmann D, Menzel D, Baluska F (2006) Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Signaling and Behavior* 1 (3):122-133
- Schnable PS (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112-1115

- Schreiber L, Franke R, Hartmann K (2007) Chemical composition of apoplastic transport barriers in roots. Quantification of suberin depositions in endodermal and hypodermal root cell walls. In: Sattelmacher B, Horst WJ (eds) *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*. pp 109-117
- Schreiber L, Franke R, Hartmann KD, Ranathunge K, Steudle E (2005) The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of Experimental Botany* 56 (415):1427-1436
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* 50 (337):1267-1280
- Smith S, De Smet I (2012) Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367:1441-1452
- Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubová O (2007) Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist* 173 (2):264-278
- Soukup A, Malá J, Hrubcová M, Kálal J, Votrubová O, Cvikrová M (2004) Differences in anatomical structure and lignin content of roots of pedunculate oak and wild cherry-tree plantlets during acclimation. *Biologia Plantarum* 48 (4):481-489
- Soukup A, Tylová E (2014) Essential methods of plant sample preparation for light microscopy. In: *Plant Cell Morphogenesis*. Springer, pp 1-23
- Soukup A, Votrubová O, Čížková H (2002) Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* 153 (2):277-287
- Sreevidya VS, Hernandez-Oane RJ, Gyaneshwar P, Lara-Flores M (2010) Changes in auxin distribution patterns during lateral root development in rice. *Plant Science* 178:531-538
- Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* 10 (8):946-954
- Szymanowska-Puřka J, Nakielski J (2010) The tensor-based model for growth and cell divisions of the root apex. II. Lateral root formation. *Planta* 232:1207-1218
- Teale WD, Paponov IA, Ditengou F, Palme K (2005) Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 123:130-138
- Tian H, De Smet I, Ding Z (2014) Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends in Plant Science* 19 (7):426-431
- Van Norman JM, Xuan W, Beeckman T, Benfey PN (2013) To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development* 140 (21):4301-4310
- Van Tieghem P, Douliot H (1888) Recherches comparatives sur l'origine des membres endogènes dans les plantes vasculaires. *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 7 (8):1-660 In: Bell D, McCully ME (1970) A histological study of lateral root initiation in *Zea mays*. *Protoplasma* 1970:1179-1205
- Varney GT, McCully ME (1991) The branch roots of *Zea*. II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New Phytologist* 118:535-546
- Vermeer JE, von Wangenheim D, Barberon M, Lee Y, Stelzer EH, Maizel A, Geldner N (2014) A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science* 343 (6167):178-183
- von Guttenberg H (1968) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. 2 edn. Borntraeger, Berlin, pp 41-84

- Wang H, Taketa S, Miyao A, Hirochika H, Ichii M (2006) Isolation of a novel lateral-rootless mutant in rice (*Oryza sativa* L.) with reduced sensitivity to auxin. *Plant Science* 170:70-77
- Wang X, McCully M, Canny M (1995) Branch roots of *Zea*. V. Structural features that may influence water and nutrient transport. *Botanica Acta* 108 (3):209-219
- Wightman F, Thimann KV (1980) Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots.1. Sources of primordia-inducing substances in the primary root of pea-seedlings. *Physiologia Plantarum* 49 (1):13-20
- Wilson CA, Peterson CA (1983) Chemical composition of the epidermal, hypodermal, endodermal and intervening cortical cell walls of various plant roots. *Annals of Botany* 51:759-769
- Woll K, Borsuk LA, Stransky H, Nettleton D, Schnable PS, Hochholdinger F (2005) Isolation, characterization, and pericycle-specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant *rum1*. *Plant Physiology* 139:1255-1267
- Yamaji N, Ma JF (2007) Spatial distribution and temporal variation of the rice silicon transporter *Lsi1*. *Plant Physiology* 143:1306-1313
- Yue K, Beeckman T (2014) Cell-to-cell communication during lateral root development. *Molecular Plant* 7 (5):758-760
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L (1999) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209:1-12
- Zimmermann HM, 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 HM, Steudle E (1998) Apoplastic transport across young maize roots effect of the exodermis. *Planta* 206:7-20
- Zimmermann R, Sakai H, Hochholdinger F (2010) The *gibberelic acid stimulated-like* gene family in maize and its role in lateral root development. *Plant Physiology* 152:356-365