

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin
Anatomie a fyziologie rostlin



shrnutí dizertační práce

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

Eva Pecková

Vedoucí dizertační práce:
RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

Praha 2014

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.

Finanční zajištění práce:

GAUK 251346, COST LD 11017 a MSM 0021620858

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	2
ABSTRAKT	4
1. LITERÁRNÍ ÚVOD	5
2. CÍLE PRÁCE.....	9
3. MATERIÁL A METODY	10
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	11
4.1 Vliv mutace genu LRT1 na vývoj postranních kořenů kukuřice (<i>Zea mays</i>).....	11
4.2 Detekované změny v hlavních kořenech <i>lrt1</i>	13
4.3 Vývoj apoplastických bariér v rámci kořenového systému kukuřice (<i>Zea mays</i>) za různých podmínek prostředí.....	14
4.4 Rozdíly ve vývoji endodermis mezi hlavním a postranními kořeny; vliv podmínek prostředí	15
4.5 Srovnání vývoje exodermis a její propustnosti v rámci kořenového systému; vliv kultivačních podmínek	16
4.6 Problémy s detekcí exodermálních Casparyho proužků v hypoxické kultivaci.....	17
4.7 Testy propustnosti	18
4.8 Propustnost exodermální bariéry	18
4.9 Porovnání pohybu jednotlivých apoplastických sond v primární kůře	19
4.10 Chování apoplastických sond ve špičkách hlavních kořenů	20
4.11 Chování apoplastických sond v postranních kořenech.....	21
5. ZÁVĚRY	23
6. SEZNAM LITERATURY	24
7. PUBLIKACE A PREZENTACE UVEDENÝCH VÝSLEDKŮ	30
8. ŽIVOTOPIS	31

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.

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

Předkládaná dizertační práce se věnuje skryté části rostlin – kořenovému systému, jehož podstatnou součástí jsou postranní kořeny, které tvoří obvykle hlavní část absorpčního povrchu rostliny v rhizosféře. Apoplastické bariéry omezují nekontrolovatelný tok látek do rostliny. Mechanismy, které ovlivňují tvorbu postranních kořenů a apoplastických bariér, 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 (Enstone et al. 2003; Laskowski 2013; Malamy 2005; Rich and Watt 2013).

Postranní kořeny vznikají obvykle postembryonálně (Dubrovsky et al. 2000; Esau 1965; Laskowski et al. 1995; Tian et al. 2014). Vývoj postranních kořenů byl detailně popsán u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), (Malamy and Benfey 1997). Zahrnuje osm fází od dělení zakladatelských buněk, přes mnohačetná přesně organizovaná dělení vznikajícího primordia až po vynoření postranního kořene z rodičovských pletiv. Obecně platí s určitými omezeními i u trav. Vývoj postranního kořene končí diferenciací vodivých pletiv a jejich následným napojením na vodivá pletiva rodičovského kořene (Esau 1965). Vznik postranních kořenů je regulován vnějšími (Casimiro et al. 2003; Krishnamurthy et al. 2009; Malamy 2005) a vnitřními (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) faktory, které spolu intereagují.

Jedním z důležitých nástrojů funkční genomiky pro objasnění mechanismů iniciace, tvorby a růstu postranních kořenů je využívání mutantních rostlin. Množství takovýchto mutantů mimo modelovou rostlinu huseníček (*A. 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 kukuřice (*Z. mays*) zatím byly popsány jen čtyři mutantní genotypy s poruchami v utváření postranních kořenů - *slr1* (*short lateral roots 1*), *slr2* (*short lateral roots 2*), *rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*) a *lrt1* (*lateral rootless 1*) (Hochholdinger and Feix 1998; Hochholdinger et al. 2001; Woll et al. 2005).

Monogenní recesivní mutant *lrl1* vznikl EMS (ethylmethan sulfonát) mutagenézí kukuřice (*Z. mays*). 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 popsánému 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 chování mutanta *lrl1* bylo na počátku naší práce velmi omezené. Částečná obnova tvorby postranních kořenů se podařila při působení arbuskulární mykorrhizy a/nebo při zvýšení dodávky fosfátů (Paszkowski and Boller 2002), fenotypem ale velmi vzdálené od původního genotypu. Exogenní aplikace auxinu na klíčící semena neměla žádný vliv na obnovení tvorby postranních kořenů (Hochholdinger and Feix 1998) a nebyly pozorovány změny ani v lokalizaci PIN 1 (PIN-FORMED 1) přenašeče a v polárním auxinovém transportu (Schlicht et al. 2006). 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 *lrl1*. 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. Apoplastické bariéry omezují nekontrolovaný příjem látek z prostředí. Endodermis je obecně přítomná apoplastická bariéra nacházející se v kořenech všech semenných rostlin (Esau 1965; Geldner 2013). 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). Vývoj bariéry je u většiny rostlin postupný a obvykle jsou rozlišována tři stádia - vytvoření Casparyho proužků, suberinové lamely a následné sekundární tloušťnutí buněčné stěny (Esau 1965). 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). Oproti relativně

konzervativní struktura endodermis se tvorbou 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). Podobně jako endodermis prochází třemi stádii vývoje (Hose et al. 2001). 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 (*Phragmites australis*), (Ranathunge et al. 2003; Soukup et al. 2002). Jejich rozsah je však ovlivněn podmínkami prostředí. 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. 1999; Soukup et al. 2002). 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*).

Tato problematika byla již mnohokrát publikována s použitím různých podmínek prostředí, i různých druhů rostlin. Rozdíl 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). 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 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 (*Z. mays*), (Redjala et al. 2011; Wang et al. 1995), histochemicky detekována u rákosu (*P. australis*), (Soukup et al. 2002), naopak v rýži (*O. 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.). 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. 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.

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 (*Z. mays*) s indukovanou tvorbou exodermis a na kořenech rýže (*O. 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 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.

2. CÍLE PRÁCE

I. Hlavním cílem je detailní analýza kořenového systému mutanta *lrt1* kukuřice

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 diferenciaci 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

3. MATERIÁL A METODY

Jelikož je tato sekce detailně rozepsána v jednotlivých článcích/manuskriptech, prezentuji zde jen seznam použitého materiálu a metod.

Rostlinný materiál

Kořenový systém kukuřice seté, *Zea mays* L., B73 genotyp a mutant *lrt1* (*lateral rootless 1*); *Zea mays* L., cv. Cefran; rýže seté, *Oryza sativa japonica*, var. Nipponbare.

Zpracování vzorků

Pro zpracování vzorků byly použity ruční řezy i trvalé preparáty v kombinaci s různými histochemickými barvenými, včetně detekce aktivity peroxidázy. Vybrané části kořenů byly projasňovány. Byla testována propustnost pletiv a kvantifikován obsah ligninu. Obrazová analýza byla také použita v této práci. Pro pozorování byla využita technika světelné mikroskopie (světlé pole, DIC, fluorescence), konfokální mikroskopie, skenovací, popř. transmisní elektronové mikroskopie.

4. VÝSLEDKY A 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 mykorrhizy na částečné obnovení tvorby postranních kořenů byl popsán již dříve (Paszkowski and Boller 2002). Proto pro širší zhodnocení výsledků jsme 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 však 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). Tomu 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 iniciace primordií časově zpožděna, 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 dělicích 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 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 (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. 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 popsáno 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, tzv. 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 pouze v kultivaci mezi vlhčenými listy filtračního papíru. Pozorované nepravidelnosti v uspořádání povrchových vrstev měly zřejmě negativní vliv na správnou organizaci Casparyho proužků v exodermis.

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 u *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, zaplavená půda a perlit s pískem.

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

Endodermis tvoří vnitřní apoplastickou bariéru. 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. 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 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 neutváří kořeny příliš silnou endodermální bariéru, což potvrzují i data Enstone and Peterson (2005). Naopak přítomnost toxických kovů, směs písku/perlitu a zasolení stimuluje 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 místní 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. 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, v těch krátkých v menší míře. Depozici terciární buněčné stěny jsme nepozorovali u žádné z variant, u žádného typu kořenů, podobně též Enstone and Peterson (2005). 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. V kultivacích s pevným substrátem se vytvářely silné Casparyho proužky, a to i ve většině velmi krátkých postranních kořenů. Exodermis v postranních kořenech 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. 2000) a u kukuřice (*Z. mays*) rostlé v aeroponické kultivaci (Enstone and Peterson 1998; Redjala et al. 2011; Zimmermann et al. 2000), která se svými vlastnostmi blíží kultivaci v pevném substrátu více než hydroponii, podporují důležitost exodermis také u primárního kořene v těchto podmínkách. 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. Salinita v hlavních kořenech bavlníku (*Gossypium hirsutum*), (Reinhardt and Rost 1995), rýže (*Oryza sativa*), (Krishnamurthy et al. 2009) či skočce (*Ricinus communis*), (Schreiber et al. 2007) stimulovala vývoj prvního i druhého 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 zesilovaly Casparyho proužky.

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 „zasazené“ kyselinou jodistou se ukázaly mnohem vyšší rozdíly mezi jednotlivými typy kořenů, což však přímo souviselo 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. 3.3.2.

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 u stejného materiálu, kde autoři histochemicky také nedetkovali 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 elektrondenzní 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. 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 souviset se změnou obsahu, popř. i způsobu depozice

ligninu a suberinu v prouzcích. 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 prouzcích 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 bariérou 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*), Fe^{2+} (Soukup et al. 2002) nebo berberin (Meyer et al. 2009; Soukup et al. 2002) nedokázaly prostoupit přes tuto externí bariéru. Jinou situaci jsme však pozorovali u kyseliny jodisté, která i u rýže (*O. sativa*) prošla skrz bariéru. U této sondy jsme zjistili 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 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 buněčných stěn trav také obtížná. To jsou zřejmě důvody, proč v literatuře můžeme nalézt výsledky z řezů jen velmi ojediněle (Peterson et al. 1981).

4.9 Porovnání pohybu jednotlivých apoplastických sond v primární kůře

U kukuřice (*Zea mays*) prošly 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 byl po 30, popř. 60 minutách téměř zanedbatelný. Pouze Fe^{2+} dosáhly za stejnou dobu 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 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. 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 prostorách, 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 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, nicméně 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 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 Fe^{2+} znesnadnit jejich vstup do apexu. To bylo zdokumentováno pro některé další kationty, např. 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). Naopak u agáve (*Agave deserti*) barvilo 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 nespécifické 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. 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 příliš 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 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 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 hrála tloušťka kořene (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

6. SEZNAM LITERATURY

- 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 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
- 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
- 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
- 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, Beekman 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, Beekman 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
- 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, 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Husáková E (2006) *Regulace vývoje postranních kořenů*. Charles University, Prague
- 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
- 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 Angiospermenwurzeln. *Bibliotheca Botanica* 59:1-151
- 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 MJ, Williams ME, Nusbaum H, Sussex IM (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121:3303-3310
- 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
- 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 (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
- 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
- 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
- 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
- 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, 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, Lefcourt (1990) Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Canadian Journal of Botany* 68:2729-2735
- 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 (1999) 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, Kinsley LJ, Broderick J (2000) 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
- 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
- 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, 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, Ditungou 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
- 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
- von Guttenberg H (1968) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. 2 edn. Borntraeger, Berlin, pp 41-84
- 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

7. PUBLIKACE A PREZENTACE UVEDENÝCH VÝSLEDKŮ

Husáková, E., Soukup, A., Hochholdinger, F. (2013). Lateral root development in the maize (*Zea mays* L.) *lateral rootless1* mutant. *Annals of Botany* 112(2): 417 - 428.

Pecková, E., Tylová, E., Soukup, A. Tracing the root permeability.

Tylová, E., **Pecková, E.**, Blascheová, Z., Soukup, A. Apoplastic barriers in lateral roots of *Zea mays* L. under various environmental conditions.

Podíl na experimentální práci cca 45%.

Husáková E., Soukup A. (2011). Root structure and development in rootless maize mutant *lrt1*. 7th International Symposium on Structure and Function of Roots, High Tatras. Slovakia
The first place for the best poster presentation

Husáková E., Soukup A. (2010). Anatomical characterization of root system of maize mutant *lrt1*. FESPB, Valencia, Spain. Poster presentation

Husáková E., Soukup A. (2010). Analysis of root development and lateral root initiation within *lrt1* mutant. KDEBR and KEBR, Prague. Poster presentation

Husáková E., Soukup A. (2009). Anatomical analysis of *lrt1* maize mutant. RootRAP, Vienna, Austria. Poster presentation

Lenochová Z., **Husáková E.** (2007). Influence of cultivation conditions and phytohormones on aerenchyma formation in maize roots. KEBR, Olomouc. Poster presentation

8. ŽIVOTOPIS

Jméno	Eva Pecková, roz. Husáková
Narozena	23.5.1984 v Pardubicích
Trvalé bydliště	Zelenohorská 505/19, Praha 8 Bohnice, 181 00
Národnost	česká
Kontakt	+420 604 462 202, e.hu@seznam.cz

Vzdělání

2008 – nyní	doktorské studium, KEBR, Přf UK, obor Anatomie a fyziologie rostlin
2013	získán titul RNDr., Přf UK
2011	státní doktorská zkouška, Přf UK
2010	získání certifikátu o pedagogické způsobilosti pro výuku biologie
2005 – 2008	magisterské studium, KFR, Přf UK, obor Biologie, titul Mgr.
2003 – 2005	bakalářské studium, KFR, Přf UK, obor Biologie, titul Bc.
1999 – 2003	Gymnázium Přelouč

Ovládané metody, zahraniční stáže a zkušenosti

Eva Pecková, roz. Husáková vystudovala obor Odborná biologie na Přf UK - bakalářskou práci na téma „Regulace vývoje postranních kořenů“ a diplomovou práci na téma „Struktura kořene kukuřice; vliv fytohormonů“ obhájila na Katedře fyziologie rostlin (dnes Katedře experimentální biologie rostlin). V současnosti na téže katedře podala k obhajobě dizertační práci. Během celého studia byla členem Laboratoře fyziologické anatomie pod vedením Dr. Votrubové, poté Dr. Soukupa. Zde získala zkušenosti se světelnou, fluorescenční, elektronovou a částečně konfokální mikroskopií, analýzou obrazu, imunofluorescenčními, barvicími, histochemickými metodami a různými typy kultivace rostlin. Modelové organismy, se kterými především pracovala, byly pšenice (*Triticum aestivum*), kukuřice (*Zea mays*) a rýže (*Oryza sativa*). Od roku 2008 je též zaměstnancem katedry. Podílela se na organizaci různých akcí pořádaných katedrou a na výuce praktických cvičení (Anatomie rostlin, Fyziologie rostlin a Botanické mikrotechniky). V roce 2011 - 2012 byla hlavní řešitelkou grantu GAUK 251346. Ten, společně se získaným Fondem mobility UK, jí umožnil v roce 2012 absolvování tříměsíční stáže v laboratoři prof. Hochholdingera (INRES, Univerzita v Bonnu, Německo). Účastnila se práce na tématu „Cloning of candidate genes for novel Aux/IAA mutants“, díky čemuž se seznámila se základními molekulárně biologickými postupy. Zde také konzultovala tehdy připravovanou publikaci o mutantu *lrt1*. O rok později byla zaměstnána na poloviční úvazek jako technický pracovník a konzultant v Dendrochronologické laboratoři, ČZÚ. V roce 2014 absolvovala čtyřměsíční stáž v laboratoři prof. Aalen (Univerzita v Oslu, Norsko), kde si jednak prohloubila znalosti molekulárních technik, aplikovala dosud naučené metody z mateřské laboratoře na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* a získala cenné kontakty. Své výsledky prezentovala na konferencích formou plakátových sdělení (KEBR 2007, Olomouc; RootRAP 2009, Vienna, Austria; KDEBR/KEBR 2010, Praha; FESPB 2010, Valencie, Španělsko; ISSR 2011, Vysoké Tatry, Slovensko). Za posledně jmenovaný poster získala autorka první místo. Své výsledky týkající se výzkumu vývoje postranních kořenů u *lrt1* publikovala v časopisu *Annals of Botany*.

Ve svém volném čase se momentálně věnuje zejména rodině. Pokud zbývá čas, tak ráda čte, paličkuje, cestuje a projíždí se na GSX-R.

Charles University in Prague

Faculty of Sciences

Department of Experimental Plant Biology

Plant Anatomy and Physiology



Summary of the Ph.D. Thesis

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

Eva Pecková

Thesis Supervisor:

RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

Prague 2014

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thank my supervisor RNDr. Aleš Soukup, Ph.D. for his professional advice, inspiring comments and recommendations so important for writing this thesis.

I would also like to thank RNDr. Edita Tylová, Ph.D. for her help, obligingness and creation of friendly environment and RNDr. Olga Votrubová, CSc. for her ability to encourage me in every situation.

My thanks also belong to all the other colleagues in our laboratory and to all other members of the Department of Experimental Plant Biology in Prague for creating a pleasant working environment.

Finally, I thank my family and friends who supported me deeply during the study and especially during completion of my work.

I thank also my husband for his understanding, emotional support and extraordinary patience.

Financial support of this work:

GAUK 251346, COST LD 11017 and MSM 0021620858

CONTENT

ACKNOWLEDGEMENT	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCTION.....	5
2. AIMS OF THE THESIS	9
3. MATERIAL AND METHODS	10
4. RESULTS AND DISCUSSION	11
4.1 Effect of LRT1 gene mutation on development of maize (<i>Zea mays</i>) lateral roots.....	11
4.2 Detected changes in <i>lrt1</i> main roots.....	13
4.3 The development of apoplastic barriers within the root system of maize (<i>Zea mays</i>) under different environmental conditions	14
4.4 The differences in endodermis development between primary and lateral roots; effect of cultivation conditions.....	14
4.5 Comparison of exodermis development and its permeability within the root system; effect of cultivation conditions	15
4.6 Problems with detection of exodermal Casparian strips under hypoxia.....	17
4.7 The permeability tests	18
4.8 Permeability of exodermal layer	18
4.9 Comparison of movement of apoplastic tracers in cortex	19
4.10 The behavior of apoplastic tracers in main root apices.....	20
4.11 The behavior of apoplastic probes in lateral roots	21
5. CONCLUSIONS	23
6. REFERENCES	24
7. PUBLICATIONS AND PRESENTATION OF THE RESULTS	30
8. CURRICULUM VITAE	31

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 primordia of *lrt1* takes place and is strongly dependent on environmental conditions. The structure of primordia, and also their emergence and later development is strongly affected. On the contrary, the main roots do not show so strong influence of 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 substances of root surface.

Changes in permeability of surface layers led us to the issue of apoplastic barriers, which was tested on the traditional 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 prominent 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. INTRODUCTION

This thesis is devoted to the hidden half of plants – the root system. Plant roots are the essential part and form the major component of the absorbent surface of plant in the rhizosphere. Apoplastic barriers restrict uncontrolled flow of substances to the plant. Mechanisms that affect the formation of lateral roots and apoplastic barriers have a significant impact on their survival under certain stress conditions, such as drought, nutrient deficiencies and allow them to effectively utilize and compete for soil resources (Enstone et al. 2003; Laskowski 2013; Malamy 2005; Rich and Watt 2013).

Lateral roots are mostly formed postembryonally (Dubrovsky et al. 2000; Esau 1965; Laskowski et al. 1995; Tian et al. 2014). Their development has been studied in detail in *Arabidopsis thaliana* (Malamy and Benfey 1997). It is divided into eight steps, including formation of founder cells, anticlinal and periclinal divisions and is finished with emergence from maternal root tissues. Generally this is valid in grasses with some limitations. The development of lateral roots ends with differentiation of vascular tissues and their subsequent connection to the vascular tissues of parental roots (Esau 1965). Their development is regulated by external (Casimiro et al. 2003; Krishnamurthy et al. 2009; Malamy 2005) and intrinsic factors (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), which interact together.

Using of mutant plants is one of the most important tools of functional genomics for evaluating mechanisms of initiation, formation and growth of lateral roots. The amount of types of such mutants (without *A. thaliana*) is still relatively limited. Monocot plants maize (*Zea mays*) or rice (*Oryza sativa*) have heterogeneous structure of the root system and variability in lateral root formation on primary and adventitious roots, compared to *A. thaliana* (Hochholdinger et al. 2004b; Smith and De Smet 2012). We can assume that regulatory mechanisms may vary significantly between monocotyledonous and dicotyledonous plants. It is therefore very useful to study the root development with representatives of monocots, despite of more methodical and time consuming difficulties. Only four mutants with defects in their lateral root development have been identified in maize (*Z. mays*) - *slr1* (*short lateral roots 1*), *slr2* (*short lateral roots 2*), *rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*) a *lrt1* (*lateral rootless 1*), (Hochholdinger and Feix 1998; Hochholdinger et al. 2001; Woll et al. 2005).

The monogenic and recessive mutant *lrt1* was isolated from EMS (ethylmethan sulfonate) mutagenized population of maize (*Z. mays*). It is located on the short arm

of the second chromosome, but mapping and accurate identification of this gene is still ongoing. According to the original study, this mutant seemed to be very important tool for studying initiation of lateral roots due to described defect in the early development of primary and seminal adventitious roots in early postembryonic development (Hochholdinger and Feix 1998). In this sense it was used as an experimental model – the control without primordia initiation (Hochholdinger et al. 2004a; Hochholdinger et al. 2001; Park et al. 2004). However, a detailed anatomical study specifying the phenotypic expression of the mutation was missing. The amount of information about the behavior of *lrt1* mutant was very limited at the beginning of our work. Partial recovery was reported with arbuscular mycorrhiza and/or high phosphate (Paszkowski and Boller 2002), but their phenotype was different from wildtype. Exogenous application of auxin to germinating seeds had no effect (Hochholdinger and Feix 1998) and no changes were observed in the localization of PIN 1 (PIN-FORMED 1) carriers and polar auxin transport (Schlicht et al. 2006). It seems that this mutant is affected in other aspects of the lateral root regulation than auxin and its polar transport. It can be expected that identification of this gene will be very important contribution to the group of regulatory mechanisms not involving auxin.

The present work, however, does not focus only on the description of lateral roots, but provides overall view of the *lrt1* phenotype. In the first experiments mutant showed changes in the formation of exodermis and aerenchyma. Together with detected changes in the proteome (Hochholdinger et al. 2004a) showing the influence metabolism of polyphenols, we expected that this mutant would be a good model for the functional analysis of apoplastic barriers and other properties of the cortex. Apoplastic barriers prevents uncontrolled intake of substances from the environment. Endodermis is generally present apoplastic barrier in the roots of seed plants (Esau 1965; Geldner 2013). Due to modifications of anticlinal and transversal cell walls and close association with plasma membrane it restricts non-selective transport to the apoplast (Alassimone et al. 2012; Enstone et al. 2003; Rufz de Lavison 1910). Development of this barrier is sequential and generally three stages are recognized – creating of Casparian strips, suberin lamellae and subsequent secondary cell wall thickening (Esau 1965). A similar type of endodermis barrier is exodermis forming under the epidermis of the root of the most angiosperms (Hose et al. 2001; Kroemer 1903; Perumalla et al. 1990; Peterson 1988; von Guttenberg 1968). Compared to the relatively conservative structure of the endodermis, exodermis formation and its character varies in different plant species, cultivars, but even in the same species in dependence on the age and the conditions where roots grow (see below). Also exodermis undergoes three stages

of development (Hose et al. 2001). In comparison with endodermis, which is created constitutively, some plants produce exodermis only after induction by external conditions, typical example is maize (*Z. mays*). Environmental conditions often determine also the differentiation along the main axis root and effectiveness of forming barriers (Enstone and Peterson 1997). In contrast e.g. rice (*O. sativa*) or common reed (*Phragmites australis*) create this barrier constitutively (Ranathunge et al. 2003; Soukup et al. 2002), but their extension is influenced by environmental conditions. The presence of the barrier greatly determines the transport parameters of the root (Baxter et al., 2009) and thus the intake of nutrients and water, entry of toxic compounds, pathogens and mycorrhizal colonization (Begg et al. 1994; Enstone et al. 2003; Lux et al. 2011; Schreiber et al. 2007). It can be assumed that it also affects the internal environment of the root and the subsequent development of tissues, and their resistance to adverse environmental conditions. Root tissue differentiation takes place in the context of other developmental events that cannot be considered completely independent. Spatial relationship and coordination between aerenchyma development, initiation and growth of lateral roots and suberin deposition in radial and longitudinal direction in maize (*Z. mays*) and common reed (*P. australis*) was described (Armstrong et al. 2000; Enstone and Peterson 1997; Seago et al. 1999; Soukup et al. 2002). At the beginning of our work we hypothesised that if mutation affected the mutant ability to effectively regulate its internal environment, it could significantly influence the progress of differentiation of other tissues, including lateral root development from their initiation to their emergence from maternal tissues. The present work therefore provides not only evaluation of initiation and growth of lateral roots but also assesses the development of the surrounding tissues and compares these processes. However during our work we observed that mutation affects many other parameters in the strong dependence on cultivation conditions. Therefore this mutant is not suitable model for the larger study of apoplastic barriers. In addition, because target gene was still not identified, we changed our plans and fully completed only the part focused on lateral roots. According to the high variability and significant problems with *lrt1* cultivation of plants from heterogeneous population of seeds and especially its high sensitivity to environmental conditions, the study about hypodermal layers development was performed on another ecotype of maize (*Z. mays*).

This topic has frequently been published with using a variety of environmental conditions, as well as different plant species. The differences are reflected in the development of the barriers at given areas, in their chemical composition, thickness of Casparian strips in radial cell walls along the root axis and the distance of their creation from the apex

(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). All of these publications focus only on the main root and other parts of the root system were neglected. Different reactions at apoplastic barrier level were observed in barley (*Hordeum vulgare*), where no exodermis was detected in seminal roots and first generation of nodal roots, but was created in next generation of nodal roots (Gierth et al. 1999; Lehmann et al. 2000). Although lateral roots form major and most important part of root system, information about them are very fragmentary and unsystematic. The majority are results of experiments with apoplastic probes (Aloni et al. 1998; Soukup et al. 2002; Yamaji and Ma 2007) focusing on comparison of permeability between main and lateral roots (Aloni et al. 1998). Another work addresses the question of whether substances penetrate into the root through the gaps created during emergence of lateral roots (Peterson et al. 1981) or through the lateral root and its vascular tissues (Enstone and Peterson 1998; Faiyue et al. 2010; Soukup et al. 2002). Most of this information focuses on the endodermis, the results are often contradictory (Aloni et al. 1998; North and Nobel 1996) and contain only information about non/presence of the barrier (Peterson and Lefcourt 1990). Histochemical detection of lignin or suberin (Soukup et al. 2002) or developmental stage of barrier (Reinhardt and Rost 1995) is mentioned very sporadically. Information about exodermis in higher order roots is extremely insufficient. Exodermis was detected in maize (*Z. mays*), (Redjala et al. 2011; Wang et al. 1995), histochemically detected in common reed (*P. australis*), (Soukup et al. 2002), whereas in rice (*O. sativa*) was not observed in one study (Faiyue et al. 2010) on the contrary to another work (Yamaji and Ma 2007). The only detailed information comes from studies of thick lateral roots of agave (*Agave deserti*) or citrus (*Citrus* sp.). Because of extremely fragmentary and often disparate information, we included into our study the entire root system of maize (*Z. mays*) with inducible character of exodermis and study includes the most frequently used experimental conditions such as aerated hydroponics, hypoxic hydroponics, organic acids in combination with hypoxia, salinity, various concentrations of heavy metals, soil, flooded soil and perlite/sand mixture. Genotype Cefran, which does not manifest any negative effect in its lateral root development, as was verified in our laboratory in other studies, was chosen as a model organism for this part (Hlavatá 1992; Husáková 2006; Lenochová 2004). The aim of this section was to document the variability of apoplastic barriers within the root system under different cultivation conditions. These data were also associated with a detailed analysis of the growth and branching of lateral roots.

During our study of apoplastic barriers we found out that although the permeability tests are often used and present quite feasible technique, results in individual experiments are often very different. Therefore, we have added methodical comparison into our anatomical experiments, which is crucial for the correct interpretation of the results. Selected dyes were tested on maize roots (*Z. mays*) with inducible formation of exodermis and on rice roots (*O. sativa*) with constitutively created stronger exodermis. In summary, we are discussing an important step in selection of suitable apoplastic probe and its concentration for chosen plant species, its age and type of the root. Since there is no simple selection rule, our work describes the pros and cons of each probe.

For reasons mentioned above, this thesis is divided into three separate parts including anatomical – morfological study of *lrt1* mutant under various culture conditions, description of apoplastic barrier development across the whole root system of maize (*Z. mays*) under different environmental conditions and evaluation of various permeability tests used in literature, including a discussion of their uses and their limitations with our own results.

2. AIMS OF THE THESIS

I. The main aim is a detailed analysis of the root system of *lrt1* maize (*Zea mays*) mutant

Partial aims:

- To document in detail the development of lateral roots of *lrt1*, their anatomy in various stages of development, way of penetration from maternal tissues and their subsequent growth under variable conditions of cultivation
- To quantify the initiation and growth of *lrt1* and wild type lateral roots along the axis of the primary root
- To evaluate the process of surface layers differentiation; compare the development and function of exodermal layers of *lrt1* and wild type under variable cultivation conditions and their potential impact on the penetration of lateral roots
- To describe the differences in exodermal permeability in dependence on the spatial arrangement of the individual components of the exodermal cell walls
- To compare adaptation mechanisms to the environmental conditions between *lrt1* and wild type; and assess the differences between them

II. The main aim is the documentation of the structure and function of apoplastic barriers across the root system of maize (*Z. mays*) under different environmental conditions

Partial aims:

- To compare the differences between endodermis and exodermis creation in variable types of roots (primary root, lateral roots of different orders, adventitious nodal roots) and when exposed to different environmental conditions
- To document in detail the development of apoplastic barriers in lateral roots of different length and age under variable conditions of cultivation
- To evaluate the differences in permeability of surface layers of different type of roots, and for different environmental conditions

III. The main aim is to compare different types of apoplastic tracers used in the literature and test selected probes on the selected plant material

Partial aims:

- To compare the characteristics of each apoplastic tracer used in the literature and evaluate the differences described in the results
- To select the suitable representative of individual type of probes and test them, eventually modify the methodology on the selected plant material
- To compare our results with the published works and evaluate the influence of the plant material, type of probe and concentration

3. MATERIAL AND METHODS

Since this section is described in details in the article/manuscripts, I present here only a list of material and methods.

Plant material

The root system of maize, *Zea mays* L., B73 genotype and mutant *lrt1* (*lateral rootless 1*); *Zea mays* L., cv. Cefran; rice, *Oryza sativa japonica*, var. Nipponbare.

Processing of samples

For processing the samples there were used free-hand sections and permanent sections in combination with various histochemical staining, incl. detection of peroxidase activity. Selected parts of the roots were cleared. We tested permeability of surface layers and quantified lignin content. Image analysis was also used. Light microscopy (bright field, DIC, fluorescence), confocal, transmission or scanning electron microscopy was used for observing the samples.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Effect of LRT1 gene mutation on development of maize (*Zea mays*) lateral roots

The main aim of the first part of this thesis was a detailed analysis of the root system of maize (*Z. mays*) mutant *lrt1*, which was described as mutant with defect in the formation of lateral roots in early postembryonic development (Hochholdinger and Feix 1998). We realised immediately at the beginning of this work that this mutation affects not only the development of lateral roots, but also affects the overall habitus of plants, including their reproduction. This mutant exhibited increased sensitivity to different environmental conditions. Effect of phosphate and/or mycorrhiza on the partial restoration of lateral roots has been described previously (Paszkowski and Boller 2002). Therefore we chose different types and duration of cultivation conditions for a broader evaluation of their effect on the formation of lateral roots. The first signs of formation of lateral roots as some kind of bulges on the surface of main roots we could observe in less than one week after germination in plants grown in hydroponics and few days later in plants cultivated between moistened filter paper sheets. However, their subsequent penetration was different from wild type. This mutation affects rather later stages of development of lateral roots than its initiation, as was originally assumed without detailed anatomical examination (Hochholdinger and Feix 1998). This corresponds with the results of a quantitative evaluation of initiation events expressed as initiation index (Dubrovsky et al. 2009), which takes into account the shorter cortical cells of *lrt1*. In aerated hydroponics mutant roots created even more primordia/lateral roots than wild type. It seems that although the initiation of primordia is at first delayed in mutant, later their development is significantly accelerated. This is supported also by the quantification of individual primordia stages in different areas of primary root. We could observe the first stages of primordia development between fully emerged lateral roots in the older half of main root. Due to the usual acropetal sequence of initiation described in *Arabidopsis thaliana* (Dubrovsky et al. 2006) it can be sign of a significant deceleration of development of some initiated primordia. For these reasons, this mutant cannot be used in next studies as a comparative control not forming lateral roots in early postembryonic development (Hochholdinger et al. 2004a; Hochholdinger et al. 2001; Park et al. 2004). Primordia are normally created with certain minimum distance (Dubrovsky et al. 2006). However, in mutant roots we could observe the formation of several masses of cells (probably primordia) without the expected spacing. If it is a mistake in regulation of distribution individual initiation events (Laskowski et al. 1995; Sreevidya et al. 2010) or in spatial definition of dividing primordium cells (Shuai et al. 2002) is hard to answer from

our results. Exogenously added auxin, which is closely associated with the formation of lateral roots (Swarup et al. 2008; Teale et al. 2005), does not reverse this phenotype (Hochholdinger and Feix 1998). Similarly no changes in mutant were recorded in selected components of polar auxin transport, including auxin efflux carrier PIN 1 (PIN-FORMED 1), (Schlicht et al. 2006).

There are multiple organized divisions of founder cells during the development of primordia, which give rise to certain shape of primordium typical for plant species (MacLeod and Thompson 1979; Malamy and Benfey 1997; Szymanowska-Puřka and Nakielski 2010). Interesting and very significant changes in anatomy were observed in *lrt1* primordia. Mutant primordia exhibit disturbances in the arrangement of the individual layers, they are wider at the base and some cells are much more vacuolated. We often observed induced lignification on their basis. Primordia show also strong changes in structure of developing apical meristem. Changes in primordia development are not limited only to the structure itself but also in the way of their penetration through the maternal tissues. Whether it is because of wrong regulation of coordination between primordium and overlying tissues (Swarup et al. 2008) leading to the release of the middle lamella and separation of cell walls during emergence, as was described in *A. thaliana* (Lucas et al. 2013; Péret et al. 2009; Roycewicz and Malamy 2014; Yue and Beeckman 2014) or because of secondary modifications changing mechanical properties of tissues, e.g. due to more rigid cell walls as was described in rice (*Oryza sativa*), (Justin and Armstrong 1991), is difficult to assess from the available results. Lateral roots terminate their growth very early after emergence from maternal tissues, because of early loss of apical meristem maintainance. Due to high sensitivity of the mutant to the environmental conditions and also the fact that we have observed this behavior even in very young lateral roots, we think that this is a result of mechanical pressure caused by more difficult penetration through maternal tissues. Changes in organization of apical meristem observed in adverse environmental conditions were described (De Tullio et al. 2010). Although we cannot exclude the possibility that acceleration of apical meristem termination caused by defective mechanism of cell division coordination and other development of created apical meristem. Process of termination was described also as a normal part of older lateral root development of maize (*Z. mays*) and leek (*Allium porrum*) grown in soil (Berta et al. 1990; Varney and McCully 1991). Only a small percentage of emerged lateral roots are longer than one milimeter and their morphology is very different from wild type. They are curled, wider and particularly in the epidermal and subepidermal layers there are significant changes of shape, size and consistency of the cells.

4.2 Detected changes in *lrt1* main roots

In comparison with lateral roots, main roots of *lrt1* are less affected by mutation. Their overall length is reduced and they are generally thicker. They have normal anatomy of their apex with functional, typically closed root apical meristem (Clowes 1981). It could indicate a difference in lateral and main root control which was previously described for other maize mutant lines (Hochholdinger et al. 2004c; Inukai et al. 2005). We detected some changes in cell divisions in epidermal and subepidermal layers at a certain distance from the main root tip. These irregularities were particularly noticeable in the older parts of the main roots and were seen as disturbances of standard arrangement of individual cell layers. It may be due to e.g. higher rigidity of the cell walls which does not allow to cells in surface layers to compensate for the volume growth of cells lying below them, but it may also be a result of changes in the overall cohesion of the cells. It may also be related to observed lignification in these areas. But what is cause and what consequence? How it relates to higher peroxidase activity detected in these places of mutant roots? Peroxidases play a crucial role in lignin and suberin formation, in cross-linking of cell wall components and in the metabolism of reactive oxygen species (Burr and Fry 2009). We can hypothesize that increased activity of peroxidase can cause increased rigidity of cell walls and therefore higher mechanical resistance of tissues leading to damage of those tissues during expansive growth of cells. Role of higher peroxidase activity during injury or damage is known (Almagro et al. 2009). Whether it is really the result of stress (due to the higher sensitivity of mutant plants to less favorable environmental conditions) or increased peroxidase activity and described modification of cell walls that causes the observed damage, cannot be answered yet. However it is possible that detected changes in peroxidase activity may lead to the observed changes during penetration of lateral roots, as mentioned above in this section, because ROS (reactive oxygen species) signalisation and specific activity of peroxidase are needed just for this step of lateral root development (Manzano et al. 2014).

Maize (*Zea mays*) creates an exodermis, the external apoplastic barrier, after induction by environmental conditions (Enstone and Peterson 1997). In our experiments with *lrt1*, the formation took place only in cultivation between moistened filter paper sheets. Observed irregularities in organization of surface layers had negative impact on the proper organization of Casparian strips in exodermis. The loss of continuity of the barrier was confirmed with permeability test using periodic acid. This probe was stopped by exodermis in wild type. On the contrary, it underwent in some places the exodermal barrier in *lrt1*. What is very interesting, it usually stopped its movement at third, respectively fourth cortical layer from

the surface. In hypoxic hydroponics with non-inducing effect on exodermis formation, the tracer passed up to endodermis in wild type. Interestingly in mutant penetration showed almost identical pattern as in roots with existing barrier – it penetrated only some layers from the surface. The restriction of probe penetration corresponds to the location of the observed induced lignification/suberization. We can assume that this is the answer compensating the defects in the arrangement of the surface layers and their function. Proteomic analysis of mutant showed changes associated with the metabolism of phenolic compounds and higher levels of enzymes of lignin synthesis (Hochholdinger et al. 2004a). It can be associated with response to stress or with abnormal lignification observed in the surface layers of the root and also in the pericycle. To determine whether increased synthesis of lignin is associated with response to stress or it is the overall change of *lrt1* metabolism, we quantified lignin in different parts of various old *lrt1* plants. However, we found out no changes in lignin content compared to wild type. The lignification in *lrt1* therefore can be viewed rather as a mechanism corresponding to a disturbance of internal homeostasis due to some defence reaction to perhaps less favorable cultivation conditions.

4.3 The development of apoplastic barriers within the root system of maize (*Zea mays*) under different environmental conditions

Apoplastic barriers – endodermis and exodermis, enables the control of intake of substances from external conditions to plants. The extent in which they are formed is closely connected with effect of the external conditions. Therefore we focused on the development of apoplastic barriers in maize (*Z. mays*) under the influence of various stress factors. In contrast to other works, our study gives the first systematic description of the variability of apoplastic barrier formation within the whole root system and includes also morphological analysis of root system (for more details see Sec. 3.2.2) with the accent on detailed analysis of the growth of lateral roots, their distribution and branching. We provide results obtained from the cultivation conditions inducing the most studied stress factors affecting the plants such as hypoxic hydroponics, organic acids with combination of hypoxia, salinity, various concentration of heavy metals, flooded soil and perlite/sand mixture.

4.4 The differences in endodermis development between primary and lateral roots; effect of cultivation conditions

Endodermis is the inner apoplastic barrier. It is created constitutively in all roots of seed plants (Alassimone et al. 2012; Esau 1965). Our results show that at least the first stages –

Casparian strips – form continual ring even in very short second order lateral roots, which are not mentioned often in literature. As we watched segments of various lengths and un/branched lateral roots taken one centimeter from their base and in the three-quarters of the length of the primary roots, we cannot evaluate the progress of differentiation in longitudinal direction. However, we can consider about fully differentiated barriers at these places (in root of given length and age and under concrete cultivation conditions) allowing better mapping variability of barrier formation and its extent for different types of roots within the root system. Formation of endodermis in long branched lateral roots is the most similar to the primary roots, but the third stage of their development is less common. Conversely, short lateral roots create shorter Casparian strips (in relation to radial cell walls) and next stages are developed in less extent.

The comparison of progress of endodermis differentiation under various cultivation conditions showed very interesting and strong differences mainly in short unbranched lateral roots. Generally, roots form not too strong endodermis under hypoxia, what is confirmed also by Enstone and Peterson (2005). Conversely, the presence of heavy metals, sand/perlit mixture and salinity increased the radial width of Casparian strips. Similar trend has been described previously for salinity in maize (*Z. mays*), (Karahara et al. 2004) and rice (*Oryza sativa*), (Krishnamurthy et al. 2009), after cadmium treatment (Lux et al. 2011) and when maize (*Z. mays*) plants grew on a municipal solid-waste bottom slag with high salt and high heavy metal content (Degenhardt and Gimmler 2000). High concentration of cadmium caused local changes in Casparian strips organization and supported a massive development of the tertiary cell walls. Salinity, heavy metals and sand/perlite mixture promoted also the deposition of suberin lamella, what was particularly noticeable at short lateral roots. This behavior was described also in primary roots for e.g. maize (*Z. mays*) grown in vermiculite (Enstone and Peterson 2005) and for different cultivars of rice (*Oryza sp.*) grown in soil or hydroponics both with high content of salt (Krishnamurthy et al. 2009). From our results it is evident that the effect on the level of primary roots of maize we observed is less pronounced. Hardly any suberin lamella was created in short lateral roots under other cultivation conditions. Thus, this type of roots reacts the most sensitively to environmental conditions during endodermis formation.

4.5 Comparison of exodermis development and its permeability within the root system; effect of cultivation conditions

Our results show that as in endodermis, also exodermal Casparian strips and suberin lamella are created in primary and lateral roots, in shorter ones in less extent. Tertiary cell

walls in exodermis were not observed under all treatments, in all of type roots, as in Enstone and Peterson (2005). The effect of different type of conditions we could compare due to inducible character of maize exodermis development (*Zea mays*). Again as in endodermis, long branched lateral roots had similar behavior to primary roots. Very strong Casparian strips were created in solid cultivations, even in most of very short lateral roots. The presence of exodermis in lateral roots of maize (*Z. mays*) and citrus (*Citrus* sp.) grown in soil has been mentioned earlier (Eissenstat and Achor 1999; Wang et al. 1995). Although it would be very interesting to see what effect has strongly developed exodermis in short lateral roots on their overall permeability, unfortunately these roots cultivated in such way we can hardly test by traditional methods using apoplastic probes. During their separation from the substrate there is a real risk of damage, in particular of fine lateral roots, and thus negative influence on the results (Moon et al. 1986; Varney and McCully 1991). The results from flooded soil from *Caltha palustris* and *Nymphaea odorata* (Seago et al. 2000) and from maize (*Z. mays*) grown in aeroponic cultivation (Enstone and Peterson 1998; Redjala et al. 2011; Zimmermann et al. 2000), which is more similar to substrate cultivation in its characteristics than hydroponics, support the importance of exodermis also in primary roots in these conditions. In all types of hydroponics almost no development of Casparian strips takes place, especially in short lateral roots. Decreased development of exodermis in hydroponics was confirmed with data from primary roots (Enstone and Peterson 1998; Meyer et al. 2009; Zimmermann et al. 2000). In stagnant hydroponics Casparian strips were not detectable in almost any primary roots, compared to aerated hydroponics however the suberin lamella was greatly stimulated by these conditions. Salinity stress in primary roots of cotton plant (*Gossypium hirsutum*), (Reinhardt and Rost 1995), rice (*Oryza sativa*), (Krishnamurthy et al. 2009) or *Ricinus communis* (Schreiber et al. 2007) stimulated exodermis development, but no such effect was observed in maize (*Z. mays*). Similarly to main roots (Lux et al. 2011; Redjala et al. 2011) lower doses of heavy metals caused increasing of width of Casparian strips also in longer lateral roots of maize (*Z. mays*). The results of the permeability tests showed that measuring of distance of real probe movement displays only very small differences between different types of roots. Somewhat permeable are very short lateral roots of first and second order. Higher permeability of apoplast of shorter lateral roots was also described in reed (*Phragmites australis*) and rice (*O. sativa*), (Faiyue et al. 2010; Soukup et al. 2002). When we expressed the permeability as a proportion of cortex stained with periodic acid, the results showed higher differences between different type of roots, what was directly connected with their thickness. Some papers, however, show that the distance traveled by solutes in cortex

correlates with a radial component of hydraulic resistance during flow through the root layers (Eissenstat and Achor 1999; Rieger and Litvin 1999), which is also necessary to take into account during evaluation the outcomes of these tests. For the potential effects of used probe on the results see Sec. 3.3.2.

4.6 Problems with detection of exodermal Casparian strips under hypoxia

Very strong suberin lamellae in exodermis were deposited in cultivations with low oxygen content in primary and lateral roots, but without simultaneous detection of Casparian strips. The results obtained from histochemical detection of lignin with berberine hemisulphate and floroglucinol were supplemented by transmission electron microscopy (TEM). This method was used previously with the same plant material. The authors also did not detect Casparian strips histochemically, but they observed band plasmolysis in this layer under TEM (Enstone and Peterson 1997), which is created only because of tight association of plasma membrane and cell walls in the place of Casparian strips. Unfortunately compared to endodermis, in exodermis we did not see any band plasmolysis, obviously due to the rapid deposition of suberin lamella, which disturbs this tight junction in radial cell walls (Enstone and Peterson 1997). We were also not able to clearly detect the typical electrondense strips in the area of modified radial cell walls, even on the same sections with clearly detectable endodermal Casparian strips, even in the roots where Casparian strips were brightly stained by berberine. So this method for exodermal Casparian strips detection seems not to be convenient. Also other authors had problems with their clear visualization (Clarkson et al. 1987; Eissenstat and Achor 1999; Lehmann et al. 2000; Ma and Peterson 2003). Why we did not observe Casparian strips in stagnant cultivation by histochemical detection, but in similar conditions with added organic acids we could observe these structures to some extent? Is it possible that under different conditions comes about independent regulation of Casparian strips and suberin lamellae development? The problems with detection of Casparian strips can be related to changes of their chemical properties, or e.g. the way of deposition of lignin and suberin in these strips. This idea has been mentioned by Ranathunge et al. (2005), who noticed unusually high permeability of exodermal Casparian strips in rice (*Oryza sativa*) cultivated hydroponically. They theorize that it may be due to different chemical composition compared to other plant species. Other works showed, that under different type of stress, not only total amount of alifatic and aromatic monomers is changed, but also their ratio (Schreiber et al. 1999; Zeier et al. 1999). This issue has not been completely resolved yet. Although some work on endodermis of *Arabidopsis thaliana* show that basic unit of Casparian strips is exclusively lignin, and suberin is deposited later (Naseer et al. 2012),

other works argue that in many species only suberin was detected in exodermal strips. They used only histochemical staining (Perumalla et al. 1990). Chemical analysis of other authors show that in different plant species endodermis and exodermis contain both these components (Schreiber et al. 1999; Zeier et al. 1999).

4.7 The permeability tests

In previous chapters of this thesis, I tested the permeability of surface layers of maize (*Zea mays*) *lrt1* mutant and wild type B73 with/without exodermis, and cultivar Cefran for evaluation the effect of environmental conditions in different parts of root system. During our work we found out that although the use of apoplastic tracers is widely used technique, the results from another authors are often contradictory. That is the reason why this part of thesis was created. It tests and compares selected apoplastic tracers in two genotypes with different type of exodermal formation – inducible barrier in maize (*Z. mays*), (Enstone and Peterson 1997) and constitutively created in rice (*Oryza sativa*), (Ranathunge et al. 2003). We chose four most commonly used probes – ferrous cations (Rufz de Lavison 1910), periodic acid (Soukup et al. 2002), precipitated berberine (Enstone and Peterson 1992) and PTS (trisodium 3-hydroxy-5,8,10-pyrenetrisulfonate), (Zimmermann and Steudle 1998), which differ with their charge, size and resulting behavior within the tissues and their subsequent detection. The different behavior was monitored during their passing through the exodermal layer, during their movement in cortex and also in differently old parts of root.

4.8 Permeability of exodermal layer

Although the name evokes an impermeable barrier preventing the entry of all substances, it is necessary to take it rather as a selective layer which lets pass only certain substances according to their properties, mainly size and charge (Hose et al. 2001). Our results point to this property. Apoplastic probes (ferrous cations, berberine and periodic acid) passed through the exodermis in the three quarters of main root of maize (*Zea mays*), what was previously observed for berberine (Enstone and Peterson 1998). In contrast, in plants with stronger barrier as in our rice (*Oryza sativa*), but also in common reed (*Phragmites australis*) or iris (*Iris germanica*), Fe^{2+} (Soukup et al. 2002) or berberine (Meyer et al. 2009; Soukup et al. 2002) failed in penetration through this external barrier. Different situation we could see with periodic acid, which also in rice (*O. sativa*) passed this barrier. For this probe, we have found a great variability in the behavior during use of different concentration and duration of application in roots of different species. Since after few hours it stained whole root of rice (*O. sativa*) and it is strongly oxidative, we can consider its toxic effect on the cell

membranes. In five times lower concentration it did not get further than into the epidermis in maize (*Z. mays*) even in very young parts of root without exodermis (see Sec. 3.2.2), probably due to exhaustion of its concentration already on the surface of root. However, it seems that this is species-specific issue, because this probe in higher concentration penetrated only into root epidermis (in common reed, *P. australis*) or only partially under the exodermis (*Glyceria maxima*). Both species are wetland plants with thick barrier, but they differ in its composition (Soukup et al. 2007; Soukup et al. 2002). It is obvious that because of potential negative impact on the plasma membranes we must be very careful during making conclusions about the speed of movement through the tissues. However, for evaluation of permeability of surface layers, this tool is sufficient and in many ways more reliable than “less toxic” alternatives. Therefore, we used it for testing the permeability in the first and second part of this thesis. PTS is not suitable for detection on the sections, which are essential for observing wider roots. It has very strong negative charge which gives it very low affinity to the cell walls. This obviously causes rapid washing during handling of the sections from older part of roots, where there are large intercellular spaces. Its subsequent detection is due to the strong autofluorescence of cell walls of commelinoids also difficult. This is probably the reason why in other publications we can find the results from sections very rarely (Peterson et al. 1981).

4.9 Comparison of movement of apoplastic tracers in cortex

As was written in previous chapter, Fe^{2+} , periodic acid and berberine came through the exodermis into cortex tissues of maize (*Zea mays*). It allowed us to compare the speed of their movement. The depth of penetration was dependent on the duration of exposure, but the difference after 30 or 60 minutes of exposure was almost negligible. Only Fe^{2+} ions were detected in deeper layers after the same time. This probe is the smallest in comparison with the other tracers, so it can be assumed that it should move faster. However, it is possible, that it affects negatively the plasma membranes. Potential toxic effect of Fe^{2+} was discussed in previous works (Meyer et al. 2009; Ranathunge et al. 2005; Rufz de Lavison 1910; Soukup et al. 2002). Interesting results showed comparison of one probe applied to different plant species (Enstone and Peterson 1992). Exodermis was experimentally injured in these species, what removed the effect of “delay/stop” of passing tracers through this layer. The precipitated berberine was detected in the deepest tissues of maize (*Z. mays*), it moved shorter distance from root epidermis in onion (*Allium cepa*) and sunflower (*Helianthus annuus*). Interestingly, at dicot pea (*Pisum sativum*) and bean (*Vicia faba*) it did not get deeper than a few layers from the surface, although these species do not form exodermis. The authors explain this behavior

by presence of phenolic groups in the cell walls of cortex, which can bind berberine and limit its subsequent movement (Enstone and Peterson 1992; Wilson and Peterson 1983). The difference in penetration of this probe between monocots and dicots was also mentioned by Aloni et al. (1998). We can speculate about another character of cell walls and intercellular space size. Although berberine was precipitated for better later detection and created precipitates were better holded in intercelular spaces, we observed precipitations rarely. Apparently they were washed out during handling with the sections. So conclusions reached by using this probe are less accurate. Occasionally we observed berberine also inside some cells of cortex layers in maize (*Z. mays*) and it was also described in cells of common reed (*Phragmites australis*), (Soukup et al. 2002). This may not be a sign of toxic effects on the plasma membranes (as in case of periodic acid and Fe^{2+}) because berberine is the substrate for MDR (multidrug-resistance protein) membrane carriers described in coptis (*Coptis japonica*) and some bacteria (Severina et al. 2001; Shitan et al. 2003). As we could see from text above, the presence of all tested apoplastic probes was observed in protoplast. Therefore it is very important to realize that the term “apoplastic tracer” is quite relative.

4.10 The behavior of apoplastic tracers in main root apices

Apoplastic barriers are formed in some distance from the meristem, mostly endodermis first and then exodermis at some distance from it. This distance is species-specific and varies depending on the environmental conditions and rate of root growth (Enstone and Peterson 1992; Enstone and Peterson 1997; Ranathunge et al. 2003). The area of root tip is without these barriers but it is not permeable for apoplastic probes. The authors speculate about the impact of more compact tissues with small intercelular spaces (Enstone and Peterson 1992) or mucigel. Compared to older root parts, where Fe^{2+} movement was faster than other probes, in main root apices of maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*), but also in iris (*Iris germanica*), (Meyer et al. 2009) and common reed (*Phragmites australis*), (Soukup et al. 2002) it did not enter the internal tissues. Maize (*Z. mays*) root cap cells secrete large amounts of mucigel, which can bind Fe^{2+} and impede their entry into apex. This was documented for some other cations, e.g. Cu^{2+} (Morel et al. 1986). Although PTS is very mobile in cell walls, in apex tissues of onion (*Allium cepa*) or maize (*Z. mays*) it was not detected very often (Cholewa and Peterson 2001; Peterson and Edgington 1975; Peterson et al. 1981). On the other hand, in agave (*Agave deserti*) it stained whole tips (North and Nobel 1995). However, these observations cannot be supplied with results of our examined species, because in maize (*Z. mays*) and rice (*O. sativa*) apex we noticed very strong washing out after making sections and it was very difficult to distinguish between stained spots and strongly

autofluorescent background. Moreover we detected accumulation of this dye in protoplast of some cells in young lateral roots of maize (*Z. mays*). The possibility of the influence of non-specific endocytosis is shown in the work of Cholewa and Peterson (2001), where this dye was endocytosed in non-homogeneously distributed cortical cells of young root parts. This behavior must be taken into account during postulation of the conclusions after using this probe. Periodic acid in rice (*O. sativa*) penetrated apex partially, similarly to common reed (*P. australis*), (Soukup et al. 2002). However, after four times extension of staining, it stained whole root tips. This result supports our assumption about the toxic effect of the probe on the plasma membranes. In the previous chapter, I mentioned very rare observed precipitates after detection with berberine in older root parts. In contrast, we observed many precipitates in whole apex of rice (*O. sativa*) and maize (*Z. mays*) and their presence was mentioned also in pea (*Pisum sativum*), bean (*Vicia faba*), onion (*A. cepa*), iris (*I. germanica*) and common reed (*P. australis*), (Enstone and Peterson 1992; Meyer et al. 2009; Soukup et al. 2002). It can be caused by smaller cells with smaller intercellular spaces in apices, where the precipitates are better holded.

4.11 The behavior of apoplastic probes in lateral roots

The staining ability of primordium depended on their position in maternal tissues so on their age. Non-emerged primordia of maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) were not stained by any of the probes. The situation changed when primordium reached the surface of the tissue. Fe^{2+} and periodic acid penetrated to primordium and stained its apex and root cap, similarly as in common reed (*Phragmites australis*), (Soukup et al. 2002). The precipitates of berberine were detected even in whole primordium. This is not so surprising, because no suberin lamellae in exodermis is deposited above developing primordium (Enstone and Peterson 2005). Why younger, deeper occurring primordia were not stained is difficult to answer from our observations. Since this part focused on lateral roots that is not too frequent theme in publications, we do not have too many comparisons with other results about other parts of the root. In emerged lateral roots we observed different behavior between individual probes. However, it is important to note, that these observations are made on whole organs where there can be overlap and worse spatial recognition of the signal, especially in the deeper layers. It seems the staining with Fe^{2+} depends on the thickness of lateral roots. In thinner second order lateral roots of maize (*Z. mays*) and first and second order lateral roots in rice (*O. sativa*), which creates them thinner in general, Fe^{2+} was observed in whole roots. Interestingly in thicker lateral roots of maize (*Z. mays*) no staining was found in root caps. Maybe the thicker lateral roots become closer in their

character to the main roots, e.g. with production of mucigel. Periodic acid stained whole thinner roots both of orders in maize (*Z. mays*) and rice (*O. sativa*). The cross sections showed that it penetrated up to the endodermis in thin roots, in some cases stained even whole central cylinder, but in long branched lateral roots of maize (*Z. mays*) reached only few surface layers. An important role plays the root thickness (see Sec. 3.2.2). Precipitated berberine and PTS showed interesting results. The thick maize roots (*Z. mays*) seem to be stained whole and this was confirmed with cross sections (Aloni et al. 1998). On the contrary, in thinner first and second order lateral roots of maize (*Z. mays*) probe was observed mainly in apex and in the junction to main root (same for PTS). Behind the root tip the staining was not very noticeable. This irregular staining can be caused by faster washing out from the area with bigger cells, or faster dissolving of precipitates in case of berberine. This is indicated by our observations from detection after 10 minutes of berberine staining of thin lateral roots of maize (*Z. mays*), when dye was also visible only at the tip and base of lateral roots. However, in the lateral roots of sunflower (*Helianthus annuus*), precipitations were detectable in whole cortex already after 5 minutes (Aloni et al. 1998). We also monitored no irregular distribution of berberine in rice (*O. sativa*). Whole lateral root was stained, but always without root cap. Similarly to main roots, we have occasionally detected PTS within some cells probably because of endocytosis (mentioned in the previous chapter), thus it was very difficult to distinguish staining from the background. It can be the reason why we observed no PTS signal in the central cylinder in comparison with the results of Faiyue et al. (2010).

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 mechanism of emergence and subsequent development of *lrt1* lateral roots is strongly affected
- The main roots show disturbances in organization of surface layers and 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 we 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 is created 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 significant 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. REFERENCES

- 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 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
- 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
- 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
- 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, Beekman 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, Beekman 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
- 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, 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Husáková E (2006) *Regulace vývoje postranních kořenů*. Charles University, Prague
- 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
- 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
- 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 MJ, Williams ME, Nusbaum H, Sussex IM (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121:3303-3310
- 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
- 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 (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
- 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
- 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
- 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
- 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, 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, Lefcourt (1990) Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Canadian Journal of Botany* 68:2729-2735
- 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 (1999) 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, Kinsley LJ, Broderick J (2000) 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
- 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
- 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, 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, Ditungou 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
- 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
- von Guttenberg H (1968) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie*. 2 edn. Borntraeger, Berlin, pp 41-84
- 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

7. PUBLICATIONS AND PRESENTATION OF THE RESULTS

Husáková, E., Soukup, A., Hochholdinger, F. (2013). Lateral root development in the maize (*Zea mays* L.) *lateral rootless1* mutant. *Annals of Botany* 112(2): 417 - 428.

Pecková, E., Tylová, E., Soukup, A. Tracing the root permeability.

Tylová, E., **Pecková, E.**, Blascheová, Z., Soukup, A. Apoplastic barriers in lateral roots of *Zea mays* L. under various environmental conditions.

Portion on experimental work about 45%.

Husáková E., Soukup A. (2011). Root structure and development in rootless maize mutant *lrt1*. 7th International Symposium on Structure and Function of Roots, High Tatras. Slovakia
The first place for the best poster presentation

Husáková E., Soukup A. (2010). Anatomical characterization of root system of maize mutant *lrt1*. FESPB, Valencia, Spain. Poster presentation

Husáková E., Soukup A. (2010). Analysis of root development and lateral root initiation within *lrt1* mutant. KDEBR and KEBR, Prague. Poster presentation

Husáková E., Soukup A. (2009). Anatomical analysis of *lrt1* maize mutant. RootRAP, Vienna, Austria. Poster presentation

Lenochová Z., **Husáková E.** (2007). Influence of cultivation conditions and phytohormones on aerenchyma formation in maize roots. KEBR, Olomouc. Poster presentation

8. CURRICULUM VITAE

Name	Eva Pecková, maiden Husáková
Date/place of birth	23.5.1984 in Pardubice
Address	Zelenohorská 505/19, Prague 8 Bohnice, 181 00
Nationality	Czech Republic
Contacts	+420 604 462 202, e.hu@seznam.cz

Qualifications

2008 – to date	PhD. study
2013	acquired RNDr. title
2011	Final State Doctoral Examination
2010	obtain a certificate of teaching competence for biology at schools
2005 – 2008	master's study, Mgr. title
2003 – 2005	bachelor study, Bc. title
2003 – to date	KEBR, Faculty of Science, Charles University in Prague
1999 – 2003	Gymnasium Přelouč

Expertise, research fellowships

Eva Pecková, maiden Husáková, graduated in Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague. She defended her bachelor thesis on “Regulation development of lateral roots” and master thesis on “Root structure of maize; effect of phytohormones” at the Department of Plant Physiology (now Experimental Plant Biology). Recently, she has offered her PhD. thesis at the same department. During her whole study she was a member of Laboratory of Physiological Anatomy under Dr. Votrubová, later Dr. Soukup. She gained experience in light, fluorescence, electron and partially confocal microscopy, image analysis, immunofluorescence, staining and histochemical methods and various types of plant cultivations. She worked especially with wheat (*Triticum aestivum*), maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). Since 2008, she is also employee at the same department. She participated in the organization of various events organized by the department and teaching of practical courses (Plant Anatomy, Plant Physiology, Botanical Microtechnique). In 2011-2012 she was awarded a grant by Charles University (GAUK), which together with obtained Mobility Fund, allowed her to spend three months in 2012 at University in Bonn (prof. Hochholdinger, Germany). She participated on topic “Cloning of candidate genes for novel Aux/IAA mutants”, what helped her to make her familiar with basic molecular biology techniques. A year later, she was employed in part-time as a technician and consultant at Department of Silviculture, Czech University of Life Sciences. In 2014 she spent four months at University in Oslo (prof. Aalen, Norway), where she extended her knowledge of molecular techniques, applied methods from her home laboratory to new model plant *Arabidopsis thaliana* and acquired new important contacts. She presented her results at conferences as poster presentations (KEBR 2007, Olomouc; RootRAP 2009, Vienna, Austria; KDEBR/KEBR 2010, Prague; FESPB 2010, Valencia, Spain; ISSR 2011, High Tatras, Slovakia). The latter named poster won the first place. Her results related to the development of lateral roots of *lrt1* were published in Annals of Botany Journal.

In her free time, she currently pays particular attention to her family. She also likes reading the books, making bobbin laces, traveling and enjoys her GSX-R.