

· Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra fyziologie rostlin



diplomová práce

Role mikrotubulárního cytoskeletu za toxického působení hlinitých iontů

Jana Krtková

vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Schwarzerová, PhD.

konzultantka: RNDr. Olga Votrubová, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Kateřiny Schwarzerové, PhD. a že nebyla předložena na žádné jiné vysoké škole.

V Praze 26. 8. 2006

Jana Krtková

Handwritten signature of Jana Krtková in black ink.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce RNDr. Kateřině Schwarzerové, PhD. za vedení celé diplomové práce, pomoc, cenné rady, obětavost, ochotu a trpělivost a své konzultantce RNDr. Olze Votrubové, CSc. za věcné připomínky.

Dále bych chtěla vyjádřit své díky Pavlovi Kobrlemu za technickou pomoc a rady, svým i jeho rodičům velmi děkuji za podporu při studiu a při vypracování diplomové práce.

Seznam použitých zkratk

AF	aktinová filamenta
BS	buněčná stěna
$[Ca^{2+}]_{cyt}$	cytosolická koncentrace Ca^{2+}
CDPK	Ca^{2+} -dependent protein kinase, na Ca^{2+} závislá kináza
CEC	cation exchange capacity, kapacita výměny kationtů
DTZ	distal transition zone, distální přechodová zóna
GA	Golgiho aparát
GdAl	působení gadolinia (1 hodinu) s následným působením Al^{3+}
GdGlu	působení gadolinia (1 hodinu) s následným působením glutamátu
GdpH	působení gadolinia (1 hodinu) s následným působením sníženého pH (4,3)
GmbH	Gessellschaft mit beschränkter Haftung, společnost s ručením omezeným
ER	endoplazmatické retikulum
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
Glu	působení glutamátu
K	kontrola
KGd	kontrola působení gadolinia
MAP	microtubule associated protein, protein asociující s mikrotubuly
MBD	microtubule binding domain, doména vázající se na mikrotubuly
MDA	malondialdehyd
MT	mikrotubuly
MTOC	mikrotubuly organizující centrum
PBS	fosfátový pufr
PAL	fenylalaninamoniumlyáza
PEP	fosfoenolpyruvát
pH	varianta se sníženým pH (4,3)
PLD	fosfolipáza D
PM	plazmatická membrána
SOD	superoxiddismutáza
WAK1	wall associated kinase 1

Obsah

1	Předmluva.....	1
2	Literární úvod.....	3
2.1	Vliv Al³⁺ na rostliny.....	3
2.1.1	Hliník.....	3
2.1.2	Al ³⁺ inhibuje růst kořene.....	4
2.1.3	Inhibice buněčného dělení.....	5
2.1.4	Morfologické změny kořene za působení Al ³⁺	5
2.1.5	Ultrastrukturální změny v kořeni za působení Al ³⁺	6
2.1.6	Buněčná stěna a působení Al ³⁺	7
2.1.6.1	Hliník a kalóza.....	8
2.1.7	Působení Al ³⁺ v symplastu.....	9
2.1.7.1	Vliv Al ³⁺ na cytoskelet.....	11
2.1.7.1.1	Mikrotubuly a Al ³⁺	12
2.1.8	Hliník a cytoplazmatická membrána.....	15
2.1.8.1	Hliník a membránový potenciál.....	15
2.1.9	Hliník, ovlivnění pH v kořeni, iontové kanály.....	16
2.1.10	Vztah Al ³⁺ a Ca ²⁺	16
2.1.11	Hliník a transport auxinu.....	17
2.1.12	Benefiční vliv Al ³⁺	17
2.1.13	Hliník a rostlina-citlivost či tolerance.....	18
2.2	Cytoskelet.....	20
2.2.1	Aktinová mikrofilamenta.....	20
2.2.2	Mikrotubuly.....	21
2.2.3	Proteiny asociované s mikrotubuly (MAP).....	24
2.2.3.1	MAP65 a jejich role v rostlinné buňce.....	28
2.2.3.1.1	MAP65-1.....	29
2.2.4	Signalizace v buňce-obecný přehled.....	30
2.2.5	Role vápníku v rostlinách coby přenašeče signálu.....	32
2.2.6	Mikrotubuly a signalizace v buňce.....	34
3	Materiály a metody.....	36
3.1	Rostlinný materiál.....	36
3.2	Sterilizace semen.....	36
3.3	Kultivace v hydroponii.....	36
3.4	Analýza růstu kořenů.....	37
3.4.1	Rostlinný materiál.....	37
3.4.2	Kultivační média.....	37
3.4.3	Snímání, měření a hodnocení délek kořenů.....	39
3.5	Vizualizace mikrotubulů pomocí imunofluorescence.....	39
3.6	Pozorování mikrotubulů a MAP65-1 <i>in vivo</i>.....	41
3.7	Mikroskopické pozorování.....	42
3.8	Zpracování obrázků.....	42
4	Výsledky.....	44
4.1	Analýzy růstu kořenů.....	44
4.2	Imunofluorescenční značení mikrotubulů.....	58
4.3	Pozorování MAP65-1 <i>in vivo</i>.....	66
4.4	Pozorování mikrotubulů <i>in vivo</i>.....	70
4.5	Hodnocení počtů a relativních tloušťek mikrotubulů.....	76
5	Diskuze.....	95

5.1	Hodnocení růstu kořene.....	95
5.2	Pozorování mikrotubulů a MAP65-1.....	99
5.3	Shrnutí.....	106
6	Abstract	109
7	Přílohy	110
8	Seznam literatury	113

1 Předmluva

Hliník je kov přirozeně se v přírodě vyskytující. Za normálních okolností je přítomen v půdě v nerozpustné formě v podobě hlinitokřemičitanů, živců či jílu. Jeho rozpustnost se ovšem velmi zvyšuje v kyselém prostředí, kdy dochází k jeho vyplavování v podobě toxických iontů z matečné horniny. Ionty Al^{3+} jsou toxické pro rostlinné i živočišné systémy. Jejich toxické působení je spojováno s projevem mnoha neurologických i jiných onemocnění člověka. Hliník sice není řazen mezi těžké kovy, ale jeho chování v půdě a účinek na rostliny vykazuje typické znaky působení těžkých kovů (Procházka *et al.*, 1998). Toxicita Al^{3+} je navíc faktor, který ovlivňuje i výskyt rostlinných druhů.

Je zřejmé, že kromě přirozeně kyselých půd se na Zemi vyskytují i půdy, které se kyselými staly až v souvislosti s činností člověka. Příčiny lze vysledovat již ve vzdálenější minulosti – změna ekonomického myšlení a nástup podnikání v 15. a 16. století vedoucí ve svém důsledku k průmyslové revoluci ve století osmnáctém, následná industrializace krajiny, začátek těžby a spalování zpočátku uhlí, posléze i ostatních fosilních paliv, to vše vyústilo v obrovské změny životního prostředí ve století dvacátém. Půda samozřejmě nebyla výjimkou, a tak, vystavena působení kyselých dešťů, se stala zároveň i místem toxického působení hlinitých iontů. Není tedy divu, že vzhledem k negativnímu aspektu na produkci kulturních plodin, stále se zvyšujícímu podílu kyselých půd a rostoucí lidskou populací zájem o problematiku hliníku stoupá.

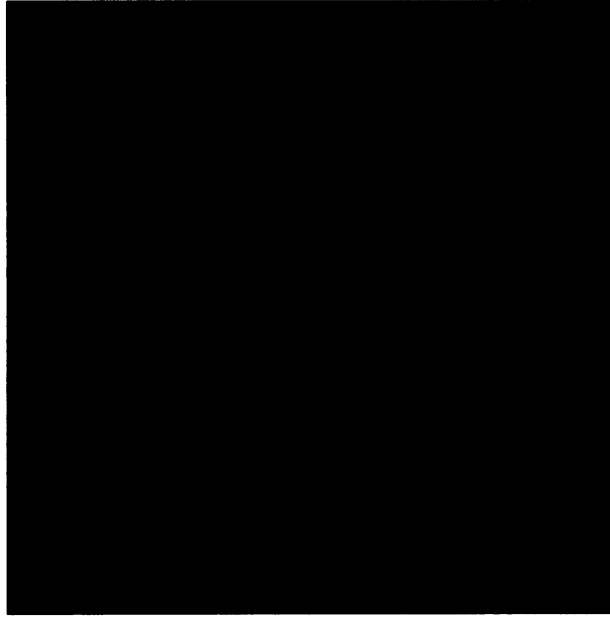
U rostlin je za působení hlinitých iontů během krátké doby zastaven růst kořene. Prvotní příčina tohoto jevu však stále není známa. Jedna z hypotéz předpokládá, že se zastavením růstu kořenů souvisí poškození kortikálních mikrotubulů. Kortikální mikrotubuly jsou skutečně jedním z prvních cílů toxického působení hlinitých iontů, neboť jejich dezorganizace nastává během prvních minut působení Al^{3+} (Sivaguru *et al.*, 2003b). Vzhledem k tomu, že k reakci kortikálních mikrotubulů dochází velmi záhy, můžeme se domnívat, že reorganizace mikrotubulů hraje roli též v přenosu signálu o působení Al^{3+} .

Cíle diplomové práce spočívaly v:

- optimalizaci kultivační metody *Arabidopsis* jako používaného rostlinného materiálu a hodnocení růstu jejích kořenů za působení médií o různém složení
- optimalizaci metody imunolokalizace mikrotubulů v kořenech *Arabidopsis*

•studiu reorganizace mikrotubulů v kořenech *Arabidopsis* v reakci na stres vyvolaný Al^{3+} pomocí metody imunofluorescenčního značení mikrotubulů a pomocí pozorování *in vivo* u rostlin exprimujících GFP-tubulin

•testování role MAP65-1 v reorganizaci mikrotubulů při jejich odpovědi na stres hlinitých iontů



Obr. 1.1 Kořenová špička GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis*

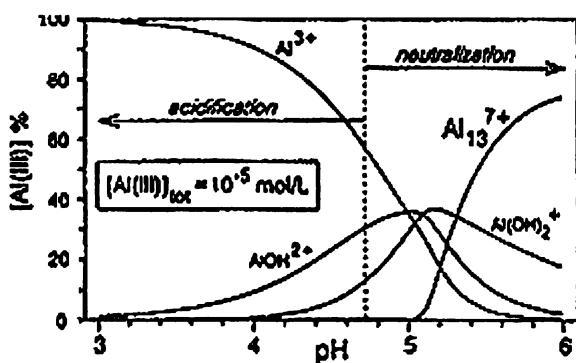
2 Literární úvod

2.1 Vliv Al^{3+} na rostliny

2.1.1 Hliník

Hliník je stříbrolesklý měkký kov, je řazen do III.A skupiny periodické soustavy prvků, jeho relativní atomová hmotnost je 26,98154. Dobře vede teplo a elektrický proud, je odolný vůči korozi. V zemské kůře je zastoupen asi 7%. Je amfoterní, tvoří převážně kovalentní vazby, někdy i iontové. V přírodě se vyskytuje jako nerozpustný v hlinitokřemičitanech, oxidech, hydroxidech nebo je vázán v půdě na organické či anorganické ligandy – organické kyseliny, proteiny, lipidy, fosforečnany, sírany a fluoridy (shrnutí viz Delhaize a Ryan, 1995; Matsumoto, 2000). Uvolňování Al iontů se však dramaticky zvyšuje se snižujícím se pH (viz Obr. 2.1). Koncentrace volného hliníku v půdním roztoku je tedy dána množstvím Al iontů uvolněných rozpuštěním sloučenin s obsahem hliníku v prostředí s nízkým pH a přítomností vazebných ligandů (Huang, 1988).

Mezi ostatními potenciálně toxickými kovy (Pb, Cd, Zn, Hg, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni) je Al v zemské kůře nejhojnější. Zájem o vysoké koncentrace Al v kyselých vodách související s působením kyselých dešťů se zvýšil poté, kdy Al^{3+} začal být spojován s některými patologickými stavy člověka. Spolupodílí se na vzniku mnoha neurologických i jiných onemocnění (Macdonald a Martin, 1988). V živých systémech se Al váže na citrát a další organické kyseliny, polyfosfáty (např. i nukleosidtrifosfáty) a anorganické fosfáty.



Obr. 2.1 Zastoupení jednotlivých forem hliníku v závislosti na pH roztoku (Furrer, 1993)

Reverzibilně se váže též na proteiny, glykosidy a polynukleotidy. Silnou vazbou se pojí s fosforylovanými proteiny asociovanými s DNA. Toxický vliv Al závisí na pH roztoku (Delhaize a Ryan, 1995). Ve vodných roztocích s $pH < 5,0$ existuje ve formě $Al(H_2O)_6^{3+}$ (osmistěnný hexahydrát), která se považuje za nejvíce toxickou a je často zkráceně nazývána Al^{3+} . Hodnota pH změřená v kyselých půdách se pohybuje okolo $pH=4,7$. Při tomto pH je koncentrace Al^{3+} tedy asi $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (viz Obr. 2.1). Pokud pH vzroste, hexahydrát deprotonuje a tvoří se $Al(OH)^{2+}$ a $Al(OH)_2^+$ (Matsumoto, 2002). Kinraide a Parker (1989) popřeli předchozí domněnku, že i formy

$\text{Al}(\text{OH})_2^+$ a $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ jsou toxické. Při neutrálním pH se vytváří forma $\text{Al}(\text{OH})_3$ a při $\text{pH} > 7$ $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, formy, které jsou podle testů prováděných na pšenici a jeteli netoxické. Velmi toxická je forma polynukleární - $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ (Al_{13} polymer). Vzniká za speciálních podmínek: její vznik závisí na poměru Al/OH v roztoku, celkovém množství Al a dalších faktorech. Její přirozený výskyt však nebyl prokázán (Delhaize a Ryan, 1995).

2.1.2 Al^{3+} inhibuje růst kořene

Prvotním projevem Al -toxicity u rostlin je inhibice prodlužování kořenů, ke které dochází často již během několika minut za působení mikromolárních koncentrací hlinitých iontů (Delhaize a Ryan, 1995; Kollmeier *et al.*, 2000). Již po 30 minutách se projevují inhibiční účinky na růst u senzitivního kultivaru kukuřice v roztoku obsahujícím $50\mu\text{M}$ AlCl_3 (Llugany *et al.*, 1995). U tolerantních kultivarů a např. i u buněčných linií tabáku BY-2 je toxická koncentrace stanovena na 90, potažmo $100\mu\text{M}$ (Kollmeier *et al.*, 2000; Schwarzerová *et al.*, 2002). Primární mechanismy inhibice růstu kořenů při Al stresu nejsou známy.



Obr. 2.2 Rostliny pěstované v živném roztoku bez (vlevo) a s (vpravo) hlinitými ionty. R. Gardner, 2003, www.sbs.auckland.ac.nz

Nejcitlivější částí kořene je kořenová špička. K inhibici růstu kořene u kukuřice stačí aplikace Al^{3+} na první 2-3 mm od špičky (Ryan *et al.*, 1993).

V rámci kořenové špičky je u kukuřice nejcitlivější distální přechodová zóna (DTZ, distal transition zone, 1-2 mm od špičky). DTZ je nejcitlivější částí kořene k různým faktorům prostředí. V této zóně se buňky přestávají dělit a připravují se na intenzivní růst. Aplikace Al^{3+} pouze v oblasti DTZ způsobuje výrazné snížení růstu buněk v prodlužovací zóně, avšak při aplikaci Al pouze do

oblasti prodlužovací zóny nebyl zjištěn žádný vliv na růst kořene (Kollmeier *et al.*, 2000). U kukuřice je DTZ nejaktivnější oblastí příjmu Al^{3+} . Vyšší tolerance k Al^{3+} se u kukuřice projevila sníženou inhibicí prodlužování kořene v oblasti DTZ, menší akumulací Al a nižší Al -indukovanou syntézou kalózy v této zóně. V buněčných stěnách této zóny byl Al zjištěn již po několika minutách. Meristematická zóna je méně citlivá k Al^{3+} , neboť aplikace Al^{3+} v této oblasti neindukovala u kukuřice žádnou inhibici růstu (Kollmeier *et al.*, 2000).

Kollmeier *et al.* (2000) předpokládají, že primární mechanismy Al -rezistence jsou u kukuřice lokalizovány v oblasti DTZ. Autoři předkládají hypotézu, že signálem

zprostředkovávajícím zastavení růstu buněk prodlužovací zóny je pravděpodobně bazipetální transport auxinů. Nicméně přesné vysvětlení, kde a jak Al^{3+} v buňkách působí, autoři nepodávají.

2.1.3 Inhibice buněčného dělení

Mezi další účinky Al^{3+} patří inhibice buněčného dělení (Clarkson, 1965). Al -indukované změny dělení buněk jsou však pozorovatelné až po 24 hodinách působení Al^{3+} (Eliášová, 2000). Silva *et al.* (2000) ukázali, že Al vstupuje již během 30 minut do buněk Al -senzitivního kultivaru sóji a je akumulován v jádrech meristematické zóny kořenové špičky. Al^{3+} poškozuje DNA (Meriga *et al.*, 2004) a svou vazbou na ni ji činí rigidnější a zabraňuje replikaci (Rengel a Zhang, 2003).

Záporný vliv Al^{3+} na růst kořenů bychom tedy mohli vysvětlit třemi způsoby. Je možné, že Al^{3+} ovlivňuje pouze dlouhivý růst buněk v kořeni, přičemž na buněčné dělení nemá vliv. Druhou možností je samotná inhibice dělení buněk. Třetím, nejpravděpodobnějším vysvětlením, je, že Al^{3+} má vliv na obě složky růstu kořene.

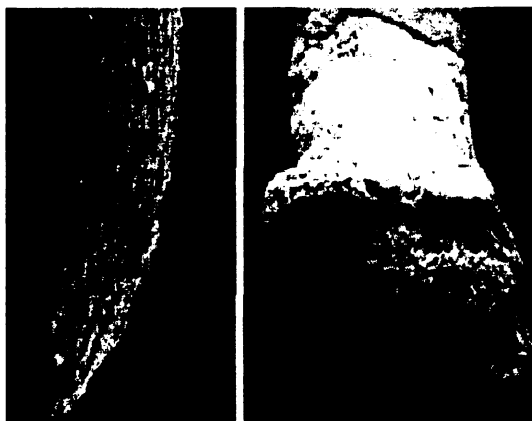
2.1.4 Morfologické změny kořene za působení Al^{3+}

Kořeny rostlin rostoucích v prostředí, kde dochází k dlouhodobému toxickému působení Al^{3+} , vykazují charakteristické morfologické změny. Nejpoškozenějšími částmi kořene jsou ty, které jsou Al stresu vystaveny nejdříve, tzn. buňky kořenové čepičky, epidermis a vnější vrstvy primární kůry. U nich dochází během 24 hodin k vakuolizaci, tloustnutí buněčných stěn a po dlouhodobějším působení i k degradaci celého buněčného obsahu (de Lima a Copeland, 1994; Čiamporová, 2002). Kořeny rostoucí v médiu s Al^{3+} pozastavují vývoj, nepravidelně se zakřivují (viz Obr. 2.3), tloustnou a mění barvu (Hlídková, 1997). Tloustnutí kořene pozorovala Raimanová (2001) po třítydenní kultivaci v $740\mu M Al^{3+}$ i u zblochanu (*Glyceria maxima*). Natékání kořenů souvisí s inhibicí dlouhivého růstu buněk 2. a 3. vrstvy kortexu a indukcí jejich tloustnutí (Raimanová, 2001).

Růst hlavního kořene i vývoj kořenů postranních je výrazně omezen, laterální kořeny se často vyvíjejí v těsné blízkosti kořenové špičky (Clune a Copeland, 1999), což souvisí s rychlejší diferenciací všech pletiv blíže meristému (Votrubová *et al.*, 1997). Postranní kořeny jsou ihned po proniknutí na povrch inhibovány v růstu, čímž vytváří drobné „korálky“ na povrchu primárního kořene (Andersson a Brunet, 1993, Votrubová *et al.*, 1997). U trav je působením hliníku stimulováno zakládání nodálních kořenů, které však rovněž mají omezenou schopnost růstu. Mění se celá architektura kořenového

systému. Zakrnělý kořenový systém není schopen využít dostatečně velký objem půdy, aby zajistil dostatečný příjem živin a vod (Andersson, 1993).

Na povrchu kořenového apexu se objevují nápadné trhliny vznikající dezintegrací a postupným odumíráním buněk epidermis a vnějších vrstev primární kůry (Votrubová *et al.*, 1997, Matsumoto, 2000). Toxické koncentrace Al vyvolávají tvorbu prasklin na povrchu kořene pšenice již během 4-8 hodin (de Lima a Copeland, 1994). Praskliny jsou



Obr. 2.3 Vliv 5 μ M koncentrace Al³⁺ po 4 dnech na povrch kořenové špičky Al-tolerantního (vlevo) a Al-citlivého (vpravo) kultivaru pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Delhaize a Ryan, 1995)

zapříčiněny dezintegrací a následnou smrtí buněk epidermis a možná vlivem tlaku vyvíjeného nateklými (ztloustlými) buňkami 2. a 3. vrstvy kortexu (Matsumoto, 2002). Toto povrchové poškození se objevuje v zóně kořenové špičky mezi 0,5-15 mm, v oblasti, kde epidermální buňky již nejsou kryty kořenovou čepičkou.

Kořenové vlásky se v závislosti na citlivosti rostliny tvoří v nižším počtu nebo je jejich tvorba úplně inhibována (Čiamporová, 2002). Při uvádění vzdáleností je nutné si uvědomit, že vzdálenosti na kořeni jsou relativní vzhledem jeho celkové menší délce způsobené inhibicí růstu. Logicky je taktéž kořen diferencován blíže špičce.

Raimanová (2001) pozorovala za působení Al³⁺ narušení koncentrického uspořádání buněk kortexu u rákosu (*Phragmites australis*) a zblochanu, tloustnutí buněčných stěn a tvorbu U-ztlustlin v endodermis blíže u báze kořene zblochanu. Čiamporová *et al.* (1995) pozorovali snížení počtu cév časného i pozdního metaxylému u trav *Nardus stricta* a *Deschampsia cespitosa* a zmenšení jejich plochy. Raimanová (2001) naopak ukazuje zvýšení počtu cév u zblochanu za působení Al³⁺.

2.1.5 Ultrastrukturální změny v kořeni za působení Al³⁺

Al-indukované změny v ultrastruktuře buněk rhizodermis kukuřice během 24 hodin zahrnují zvýšenou vakuolizaci buněk, rozvolnění mitochondriálních krist, zvýšené ukládání látek do buněčné stěny (BS), akumulaci škrobu v plastidech, tvorbu membránových seskupení vzniklých z endoplazmatického retikula (ER) a vakuol, poškození plazmatické membrány (PM), její odlučování od BS a následnou buněčnou smrt (de Lima a Copeland, 1994; Budíková, 2001).

Al^{3+} narušuje činnost Golgiho aparátu (GA), tím klesá produkce slizu v periferních buňkách čepičky, omezuje se její ochranná funkce a periferní buňky čepičky rychleji odumírají. V centrálních buňkách čepičky klesá počet mitochondrií a ER a v amyloplastech je často pozorována mobilizace škrobu. Po 24 hodinovém působení $75\mu\text{M}$ Al^{3+} na kořenovou špičku pšenice již nebyl patrný žádný škrob, došlo k dezorganizaci cytoplazmy a mohutné vakuolizaci buněk (de Lima a Copeland, 1994). U brukve vyvolala $60\mu\text{M}$ koncentrace Al^{3+} snížení počtu a velikosti buněk kořenové čepičky (Clune a Copeland, 1999).

Po prodloužení doby působení se vliv Al^{3+} projevuje také na buňkách meristematické zóny. Zvětšují se mezibuněčné prostory a objevují se poškození v BS, jádro i další organely však zůstávají zachovány (de Lima a Copeland, 1994). U pšenice došlo k ucpání sítkových elementů protofloému. Bylo pozorováno náhodné uspořádání tracheid v okolí kořenových primordií (Hlídková, 1997).

2.1.6 Buněčná stěna a působení Al^{3+}

Do apoplastu vstupuje Al snadno a rychle. Váže se na pektinové zbytky, xyloglukany, extensin, enzymy či proteiny v BS. Z proteinů BS má nejvyšší schopnost vázat Al extensin. Vazbou na různé komponenty BS Al samozřejmě ovlivňuje její vlastnosti – integritu, pružnost a propustnost (Delhaize a Ryan, 1995; Horst *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2004). Může dále dojít k vytěsnění jiných iontů (hlavně Ca^{2+}) z vazebných míst v BS a PM a narušení příjmu živin (Delhaize a Ryan, 1995; Matsumoto, 2000). Al^{3+} se silně váže na pektinové zbytky v BS, a vytěsňuje tím Ca^{2+} , zároveň ale vytěsňuje svou vazbou i protony H^+ (Postma *et al.*, 2005). Buněčné kultury kukuřice se zvýšeným obsahem pektinů byly citlivější k působení Al^{3+} (Schmohl a Horst, 2000). V souladu s touto hypotézou je poznatek, že toxicita hlinitých iontů může být zmírněna dodáním Ca^{2+} iontů (Kinraide a Parker, 1987).

Během působení Al^{3+} byly pozorovány změny v mocnosti i složení buněčných stěn. Byla indukována exprese genu pro receptorovou kinázu asociovanou s buněčnou stěnou (WAK1, wall associated kinase 1). Tento protein by mohl být součástí BS-PM-cytoskeletálního kontinua a plnit v něm specifickou funkci (Sivaguru *et al.*, 2003a). Dále byl u pšenice zaznamenán zvýšený obsah pektinů a hemicelulóz. Výraznější zvýšení nastalo u senzitivního kultivaru (Zakir Hossain *et al.*, 2006) U tykve *Cucurbita maxima* byla za působení Al^{3+} pozorována přednostní produkce hemicelulóz (Van *et al.*, 1994). Po aplikaci Al^{3+} stoupá obsah fenolických kyselin (ferulové a kumarové především). Tyto

sloučeniny mohou přispívat k rigiditě BS a poklesu její roztažnosti, jsouce prekurzory syntézy ligninu či tvořice diferulátové můstky. Pozorovaný nárůst peroxidázové aktivity může být spojen s lignifikací stejně jako s tvorbou již zmíněných můstků (Hlídková *et al.*, 2001; Zakir Hossain *et al.*, 2006). Klesá tak podíl pektinových vazebných míst pro Al^{3+} (Horst *et al.*, 1999). K lignifikaci indukované Al^{3+} ionty dochází v blízkosti kořenové čepičky, tedy v oblasti největšího poškození (Ezaki *et al.*, 2005). U citlivějších kultivarů dochází k výraznější lignifikaci. Lignifikace samozřejmě též přispívá ke zvýšení rigidity buněčné stěny a snížení růstu kořene (Zakir Hossain *et al.*, 2006).

Je zřejmé, že míra pronikání Al do vnitřních vrstev kořene závisí na složení BS. U jednoděložných rostlin s nižším obsahem pektinů v BS proniká dále než u rostlin dvouděložných (Ahn *et al.*, 2002). Bez ohledu na rostlinný druh se největší množství Al hromadí v buněčných stěnách v apikální části kořene. Neaktivnější oblastí příjmu a akumulace je DTZ (Kollmeier *et al.*, 2000). Směrem k bázi kořene, kde se u starších buněk do BS ukládá lignin, suberin a jiné fenolické látky, rychlost příjmu a ukládání Al rychle klesá.

Jak již bylo řečeno, zřejmě dochází ke zvýšení rigidity BS vazbou Al^{3+} na vazebná místa Ca^{2+} . Je možné, že právě tyto změny ve vlastnostech BS jsou příčinou inhibice růstu kořene (Rout *et al.*, 2001; Rengel a Zhang, 2003). Vytěsňování Ca^{2+} z jeho vazebných míst v apoplastu ale zřejmě nebude primární příčinou Al toxicity. V médiu obsahujícím kromě Al^{3+} a Ca^{2+} i další ionty (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Na^+) se růst kořenů zvýšil, přestože akumulace Ca^{2+} v apoplastu byla výrazně snížena. Nebyla tedy prokázána korelace mezi zvýšenou akumulací Ca^{2+} a růstem kořenů. Toto zjištění popírá hypotézu o vytěsňování Ca^{2+} hlinitými ionty jako jediné příčině zastavení růstu. Zmírnění Al toxicity přidáním ostatních iontů souviselo i se sníženou akumulací Al v kořenových špičkách. Je proto nasnadě, že i přítomnost jiných iontů než Ca^{2+} může zmírnit toxické působení Al^{3+} (Kinraide *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1997).

2.1.6.1 Hliník a kalóza

Akumulace kalózy je další z citlivých a rychlých reakcí kořenů na toxicitu Al^{3+} . Polysacharid kalóza (β -1,3-D-glukan) se v rostlině přirozeně vyskytuje v okolí plazmodezmů, kde je ukládána za účelem regulace jejich propustnosti, při virové infekci její ukládání do plazmodezmů zabraňuje šíření viru. Je přítomna též ve floému na sítkových políčkách v okolí sítkových pórů. Její tvorba se zvyšuje během obranné reakce rostlinného organismu na pronikání patogenních hub do buněčné stěny. Ukládá se

v místě pronikání houby mezi PM a BS a vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa, jelikož je velmi odolná vůči houbovým hydrolázám. Za působení Al^{3+} je ukládána do BS, která následně tloustne (Čiamporová, 2002). Produkce kalózy je závislá na depolarizaci PM a zvýšené hladině Ca^{2+} v cytosolu. Oba tyto jevy nastávají za působení Al^{3+} (Sivaguru *et al.*, 2005). Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v cytosolu sama o sobě nestačí k indukci syntézy kalózy (Bhuja *et al.*, 2004). Syntéza kalózy pozitivně koreluje s koncentrací Al uvnitř buňky a negativně koreluje s prodlužováním kořene (Massot *et al.*, 1999). Tento závěr však neplatí všeobecně. U *Cucurbita pepo* Ahn *et al.* (2002) zjistili, že syntéza kalózy s akumulací Al a inhibicí růstu kořene nekoreluje. Tyto odlišnosti lze zřejmě připsat rozdílům mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami.

Ukládání kalózy do BS je nejintenzivnější v kořenové špičce a bývá omezeno jen na vnější vrstvy primární kůry (Kollmeier *et al.*, 2000; Sivaguru *et al.*, 2000). V rámci kořenové špičky je nejvíce kalózy syntetizováno v DTZ, což souvisí s nárůstem obsahu pektinů a tím s nárůstem obsahu akumulovaného Al (Horst *et al.*, 1999; Kollmeier *et al.*, 2000; Sivaguru *et al.*, 2000). Budíková (2001) uvádí, že indukce syntézy kalózy nesouvisí s ochranou rhizodermálních buněk během stresu.

Dalším zajímavým výsledkem působení Al^{3+} bylo ukládání kalózy na plazmodezmech. Byla tak narušena komunikace mezi buňkami a symplastický transport. S místy ukládání kalózy na plazmodezmech souvisí i výskyt neobvyklého myozinu VIII a Ca-vázacího kalretikulinu. Nadměrná exprese kalretikulinu i myozinu VIII koreluje též se zvýšenou hladinou Ca^{2+} (Sivaguru *et al.*, 2000).

2.1.7 Působení Al^{3+} v symplastu

Ačkoliv nebylo dlouho jasné, zda Al^{3+} vůbec vstupuje do symplastu buněk, je podle současných názorů jeho toxicita spojena se vstupem do buněčné cytoplazmy. U sóji byl hliník v symplastu detekován v nezanedbatelném množství již po 30 minutách působení (Lazof *et al.*, 1994). Vyšší obsah hliníku byl zjištěn v symplastu senzitivního kultivaru pšenice než v symplastu tolerantního kultivaru (Tice *et al.*, 1992). Není jasné, jak Al^{3+} do symplastu vstupuje. Vzhledem ke svému náboji proniká Al^{3+} zřejmě pomaleji. Může vstupovat do buňky přes plazmatickou membránu díky vazbě na membránové proteiny, Ca^{2+} a Mg^{2+} kanálům, endocytózou nebo ve formě neutrálních ligandů (Delhaize a Ryan, 1995).

V buňce je udržována nízká koncentrace Al^{3+} iontů díky vyššímu pH cytoplazmy (6,8), a tedy tvorbě netoxických forem Al a díky dostatku možných ligandů, s nimiž hliník

rychle vytváří komplexy. Tyto komplexy mohou být transportovány přes tonoplast do vakuol, kde mohou být skladovány i v poměrně vysokých koncentracích (Delhaize a Ryan, 1995). Nicméně Al ionty právě vazbou na různé proteiny mohou interferovat s metabolickými procesy v buňce.

Interakcí se specifickými lipidy cytoplazmatické membrány vstupují do signální fosfoinozitolové dráhy (Delhaize a Ryan, 1995). Al^{3+} specificky inhibuje aktivitu fosfolipázy C a snižuje hladinu inozitol 1,4,5-trifosfátu (Jones a Kochian, 1995). Dále Al^{3+} ovlivňuje hladiny Ca^{2+} a Mg^{2+} v cytosolu, může regulovat fosforylaci a defosforylaci proteinů, nahrazuje Mg^{2+} např. v jeho vazbě na ATP a GTP. Vazba Al^{3+} je v tomto případě až 10^7 x pevnější než přirozená vazba Mg^{2+} (Delhaize a Ryan, 1995; Landino a Macdonald, 1997)

In vitro se Al^{3+} váže na významnou signální molekulu kalmodulin (o kalmodulinu viz kap. 2.2.4), pozměňuje jeho strukturu a blokuje jeho signální funkci. Kalmodulin byl pokládán za hlavní a prvotní cíl působení Al^{3+} (Siegel a Haug, 1983). Později bylo toto tvrzení vyvráceno pokusy prováděnými *in vivo*. Zablokování funkce kalmodulinu jeho inhibitorem trifluoperazinem sice mělo za následek zastavení růstu kořenů, což je efekt stejný jako za působení Al^{3+} , ale na samotný kalmodulin se Al^{3+} nevázal (Jorge *et al.*, 2001).

Je popisován vliv Al^{3+} na funkci enzymů. Byl zaznamenán vliv Al^{3+} na aktivitu nitrátreduktázy či enzymů zapojených do metabolismu cukrů (Delhaize a Ryan, 1995). Aktivita nitrátreduktázy se za působení Al^{3+} snižuje (Sharma a Dubey, 2005). Al^{3+} zvyšuje aktivitu klíčových enzymů Calvinova cyklu v listech, včetně Rubisca, NADP-glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy, fosforibulokinázy, fruktóza-1,6-bisfosfatázy a enzymu syntézy škrobu ADP-glukózapyrofosforylázy (Chen *et al.*, 2005). Byl zaznamenán zvýšený obsah glukózy, arabinózy a xylózy v kořenech v souvislosti se zvýšeným ukládáním hemicelulóz do buněčné stěny (Zakir Hossain *et al.*, 2006). U rezistentního kultivaru pšenice byl zjištěn nárůst koncentrace i dalších cukrů v cytoplazmě. Kromě glukózy to byla fruktóza a v menší míře i sacharóza. Tento nárůst byl doprovázen poklesem osmotického potenciálu a nezměněným příjmem vody do buňky. Dle autorů zůstává u rezistentního kultivaru vlivem akumulace rozpustných cukrů osmotický potenciál buněk kořene nízký, a tím buňkám umožňuje přijímat vodu a růst i přes tlak způsobovaný zpevněním BS za Al stresu (Tabuchi *et al.*, 2004)

Al stres vyvolal dále vzestup aktivity alkoholdehydrogenázy v kořenech pšenice. Totéž bylo pozorováno u sacharózasyntázy a laktátdehydrogenázy, což naznačuje přechod

k anaerobnímu metabolismu jako časný vliv Al^{3+} . Při exudaci organických kyselin po aplikaci Al^{3+} stoupla *in vitro* aktivita citrátsyntázy, malátdehydrogenázy a PEPkarboxylázy, zároveň klesá respirace v buňkách kořene (Ligaba *et al.*, 2004). Působením Al^{3+} se u pšenice zvyšuje aktivita fenylalaninamoniumlyázy (PAL), a v důsledku i obsah kumarové a ferulové kyseliny (Zakir Hossain *et al.*, 2006). Zároveň je i indukovaná exprese genu *wali4* (wheat aluminium induced), jenž kóduje fenylalaninamoniumlyázu (Snowden a Gardner, 1993).

Al ionty zapříčinily po delším působení vzestup peroxidace membránových lipidů. Peroxidace lipidů je však zřejmě až sekundárním efektem, následkem primárního poškození za Al stresu (Rengel a Zhang, 2003; Boscolo *et al.*, 2003; Meriga *et al.*, 2004). Vystavení rostlin Al stresu vede k tvorbě kyslíkových radikálů (Jones *et al.*, 2006), jež se následně mohou vázat na PM a proteiny (Boscolo *et al.*, 2003). Byla pozorována i apoptóza v buňkách kořenové špičky za působení Al^{3+} a oxidativního stresu v senzitivní kukuřičné linii (Boscolo *et al.*, 2003). Al^{3+} indukuje i expresi některých genů spojených s oxidativním stresem (peroxidáza, glutathion-S-transferáza a superoxididismutázy) (Ezaki *et al.*, 2000). Zvyšuje se aktivita peroxidázy, superoxididismutázy (SOD) a koncentrace malondialdehydu (MDA), indikátoru peroxidace lipidů v kořenech řepky a kukuřice (Basu *et al.*, 2001; Boscolo *et al.*, 2003). Inhibice růstu, koncentrace MDA a syntéza kalózy byla nižší v transgenních rostlinách řepky se zvýšenou expresí superoxididismutázy (WMnSOD, wheat MnSOD) z pšenice (Basu *et al.*, 2001; Meriga *et al.*, 2004). U transgenních rostlin *Arabidopsis* se zvýšenou expresí Al indukovaných genů (gen blue-copper binding proteinu z *Arabidopsis*, glutathion-S-transferázy z *N.tabacum*, inhibitoru GDP-disociace z *N. tabacum* a gen peroxidázy z *N. tabacum*) bylo sníženo toxické působení Al^{3+} (Ezaki *et al.*, 2000).

Za působení Al^{3+} se snižuje aktivita H^+ ATPázy i její výskyt v buňkách pokožky i primární kůry u *Cucurbita pepo* (Ahn *et al.*, 2001). Je tak ovlivněn transport H^+ ven z buňky. Zároveň se mění i tok H^+ iontů do buňky i (Ahn *et al.*, 2002). Pavlovkin a Mistrík (2001) tvrdí, že Al v krátkodobém působení nemá vliv na napětově závislou H^+ ATPázu v PM.

2.1.7.1 Vliv Al^{3+} na cytoskelet

Existuje hypotéza, že mechanismus působení hliníku na prodlužování kořene spočívá v jeho přímém vlivu na cytoskelet buněk kořenů. Tím, že působí na mikrotubulární

i aktinovou síť, následně ovlivňuje růst kořene (Grabski a Schindler, 1995; Blancaflor *et al.*, 1998; Frantziros *et al.*, 2000).

Al^{3+} zvyšuje tuhost sítě aktinových filament (AF) u buněčných kultur sóji pocházejících z kořene. Zvýšená tuhost AF může mít přímý vliv na snížení růstu kořenových buněk (Grabski a Schindler, 1995). Autoři se domnívají, že narušení kinetiky polymerace a depolymerace F-aktinu by dále mohlo být příčinou dezorganizace asociovaných cytoskeletálních struktur a změn v expresi cytoskeletálních proteinů.

Vliv Al^{3+} na AF byl zjištěn i u kořenů kukuřice. V distální přechodové zóně docházelo po působení Al^{3+} k rozpadu sítě AF (Sivaguru *et al.*, 1999a), zatímco v prodlužovací zóně kořene docházelo k tvorbě svazků a reorientaci AF (Blancaflor *et al.*, 1998). Během 2 hodin působení 50-1000 μM AlCl_3 na interfázové meristemické buňky *Triticum turgidum* svazky AF tloustly a množství AF se o 25-30% zvýšilo oproti kontrolní variantě. Po delším působení (4 hodiny) byla AF dezorganizována, tvořily se shluky aktinu ve tvaru zrn (Frantziros *et al.*, 2005).

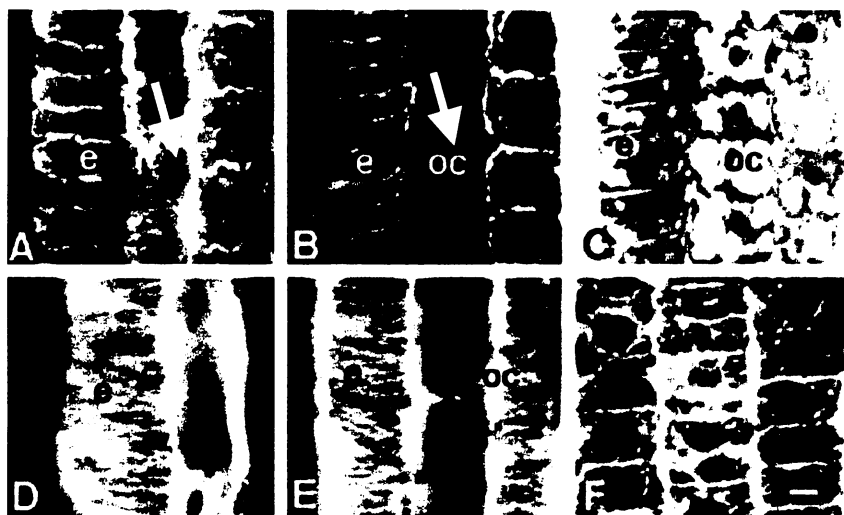
2.1.7.1.1 Mikrotubuly a Al^{3+}

Většina studií vlivu Al^{3+} na cytoskelet je zaměřena na jeho působení na mikrotubuly. Mechanismus působení hliníku na prodlužování kořene může spočívat v přímém vlivu Al^{3+} na cytoskelet buněk kořenů, na mikrotubulární i aktinovou síť, a v následném ovlivnění růstu kořene (Grabski a Schindler, 1995; Blancaflor *et al.*, 1998; Frantziros *et al.*, 2000).

V souvislosti s toxicitou Al^{3+} iontů je zvýšená pozornost věnována mikrotubulům. Zdá se totiž, že jsou jedním z prvních cílů jejich působení. Dlouhodobý efekt Al^{3+} na mikrotubuly je již po dlouhou dobu zkoumán a popsán v literatuře. Nicméně změny v uspořádání kortikálních mikrotubulů jsou pozorovatelné již během několika málo minut působení Al^{3+} . Můžeme se dokonce domnívat, že mikrotubuly a jejich tranzientní reorganizace hraje za působení Al^{3+} významnou úlohu v buněčné signalizaci.

Již v roce 1987 bylo ukázáno, že Al^{3+} se na GTP-vazebná místa tubulinu váže 10^7 krát rychleji než Mg^{2+} , zabraňuje tak hydrolýze GTP a podporuje polymeraci tubulinu (Macdonald *et al.*, 1987). Al^{3+} může tedy přímo v buňce významně ovlivnit dynamiku MT.

Reakce kortikálních MT na Al^{3+} se liší v závislosti na vývojovém stádiu buněk. Al^{3+} v 50 μM koncentraci způsobuje po 6-12 hodinách působení depolymeraci MT a změny v uspořádání u BY-2 v exponenciální fázi růstu. Tyto změny zřejmě souvisí s inhibicí růstu. Oproti tomu ve stacionární fázi růstu byla za stejného působení pozorována stabilizace kortikálních MT. Depolymerace u stacionárních buněk nastala až po zvýšení koncentrace Al^{3+} (Sivaguru *et al.*, 1999b). Tyto výsledky odpovídají i pokusům na úrovni celého kořene. Hliník má na uspořádání cytoskeletu značný vliv zejména v buňkách kořenové špičky. Nejnápadnější odchylky ve struktuře mikrotubulů (MT) způsobené Al ionty se u kukuřice projevily ve vnější vrstvě buněk distální přechodové zóny (DTZ). Bylo prokázáno, že cytoskelet buněk DTZ u kukuřice je velmi citlivý na Al^{3+} (Sivaguru *et al.*, 1999a). Reakcí na jednohodinové působení 90 μM $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ u Al-senzitivního kultivaru kukuřice bylo zmizení MT v buňkách vnější kortikální vrstvy DTZ,



Obr. 2.4 Vliv Al iontů po 1 hod aplikace Al (90 mM) na MT DTZ (A,B,C) a elongační zóny (D, E). A a D jsou kontroly. C je DIC zobrazení B. Vnější kortikální buňky DTZ jsou nejcitlivější, ztratily veškeré MTB. Žádný vliv však nebyl pozorován v elongační zóně. Extrémně husté endoplasmatické perinukleární MT byly pozorovány po 1 hod působení Al v apikálním meristému (F). e, epidermis; oc, vnější kortex. Měřítka = 8 μm od A do E a 6 μm pro F. Sivaguru *et al.*, 1999a.

zatímco v ostatních buňkách DTZ a v buňkách epidermis byly MT zachovány. Až delší aplikace Al^{3+} (6 hod.) vedla k rozsáhlejším poškozením MT v epidermis a 2-3 vnějších kortikálních vrstev buněk. V prodlužovací zóně nebyly zaznamenány žádné nápadné změny v uspořádání

kortikálních MT, nicméně prodlužování bylo silně inhibováno, zřejmě díky stabilizaci MT v této zóně (viz Obr 2.7, Blancaflor, 1998; Sivaguru *et al.*, 1999a). Všechny tyto změny ve struktuře byly předznamenány či doprovázeny Al-indukovanou depolarizací PM a syntézou kalózy, zvláště v buňkách vnější kortikální vrstvy DTZ (Sivaguru *et al.*, 1999a). Al^{3+} způsobuje depolymeraci MT a depolarizuje PM u *Arabidopsis* již během 30 minut (Sivaguru *et al.*, 2003b).

U buněčných kultur tabáku BY-2 se během prvních hodin působení Al^{3+} zvýšil počet mikrotubulárních svazků za jejich současného ztenčení. Počet svazků se zvýšil o 20-25% oproti kontrole. Počet jednotlivých mikrotubulů ve svazku se snížil z původních 12 kusů v kontrole na méně než 8 ve variantě ošetřené Al^{3+} . Současně stoupla hladina α -tubulinu, tyrozinylovaného α -tubulinu a CCT ϵ (podjednotka tubulin skládajícího komplexu CCT). Tyto jevy nastaly dlouho předtím, než se u buněčné kultury snížila viabilita. Naopak delší působení Al^{3+} iontů mělo za následek znatelnou dezorganizaci kortikálních MT a snížení hladin α -tubulinu, tyrozinylovaného α -tubulinu a CCT ϵ (Schwarzerová *et al.*, 2002).

Je známo, že Al^{3+} interaguje přímo či nepřímo s faktory ovlivňujícími organizaci cytoskeletu. Ovlivňuje hladiny Ca^{2+} (Jones *et al.*, 1998) a Mg^{2+} iontů (Miller *et al.*, 1989; Rengel, 1990). Vzhledem k těmto faktům a k tomu, že Al^{3+} způsobuje depolymeraci a změny v uspořádání kortikálních mikrotubulů velmi záhy (Schwarzerová *et al.*, 2002; Sivaguru *et al.*, 2003b), se můžeme domnívat, že kortikální mikrotubuly hrají za působení Al^{3+} iontů významnou roli. Tato role může spočívat v prostém zničení mikrotubulů vlivem Al^{3+} nebo zablokování některých jejich vlastností, následkem čehož je inhibován dlouhivý růst kořene. Výsledky Sivaguru *et al.* (2003b) však naznačují také jinou možnost, a to tu, že mikrotubuly mohou alespoň v prvních fázích působení Al^{3+} hrát roli v přenosu signálu působení Al^{3+} . Mikrotubuly by se mohly této kaskády účastnit právě rychlou, přechodnou a částečnou depolymerací v kortikální vrstvě, která vyvolává další jevy. Podle této hypotézy signální dráha zahrnuje ligandem regulované Ca^{2+} kanály, kde regulujícím ligandem je glutamát. Za působení Al^{3+} na aniontové kanály (dosud neidentifikované) se glutamát vylije z buněk kořene, naváže se na jím řízené Ca^{2+} kanály, způsobí jejich otevření a následné zvýšení hladiny cytosolického Ca^{2+} , a tím depolymeraci mikrotubulů a depolarizaci plazmatické membrány. Depolymerace MT a depolarizace plazmatické membrány nenastanou, pokud se glutamátový receptor zablokuje specifickým inhibitorem těchto kanálů, gadolinem. Na konci této, stále hypotetické kaskády, potom může stát spouštění dějů vedoucích k zástavě růstu kořene a aktivaci obranných systémů rostlin.

Pro výše popsanou hypotézu svědčí i skutečnost, že tranzientní depolymerace byla pozorována i za působení chladu (Abdrakhamanova *et al.*, 2003). Tranzientní depolymerace mikrotubulů je zřejmě spojena s vzrůstem cytosolické koncentrace Ca^{2+} , a je tak součástí signálních drah v rostlinné buňce (Wasteneys, 2004). Samotný Ca^{2+} způsobuje také depolymeraci MT (Breviario a Nick, 2000, Sivaguru *et al.*, 2003b). Samozřejmě je možné, že do signalizace jsou zahrnuty i proteiny asociované s mikrotubuly.

Signální dráha spouštěná působením Al^{3+} iontů, jež zahrnuje též kortikální MT, byla navržena Sivaguruem *et al.* (2003b). Podle této hypotézy signální dráha zahrnuje ligandem regulované Ca^{2+} kanály, kde oním regulujícím ligandem je glutamát. Za působení Al^{3+} se glutamát vylíže z buněk kořene, naváže se na jím řízené Ca^{2+} kanály, způsobí jejich otevření a následné zvýšení hladiny cytosolického Ca^{2+} , a tím depolymeraci mikrotubulů a depolarizaci plazmatické membrány. Depolymerace MT a depolarizace plazmatické membrány nenastanou, pokud se glutamátový receptor zablokuje specifickým inhibítoem těchto kanálů, gadoliniem (Sivaguru *et al.*, 2003b).

2.1.8 Hliník a cytoplazmatická membrána

PM je jedním z prvních cílů Al^{3+} , jelikož má vysoký obsah fosfátů ve fosfolipidech a tím značný negativní náboj na povrchu membrány. Al^{3+} má daleko vyšší afinitu k PM než Ca^{2+} (Matsumoto, 2000). Fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát má z membránových lipidů nejvyšší afinitu k Al^{3+} (Jones a Kochian, 1997). Al^{3+} také ovlivňuje konformaci membránových proteinů, narušuje transport iontů přes membránu a ovlivňuje hladiny Ca^{2+} (Matsumoto, 2000).

2.1.8.1 Hliník a membránový potenciál

Mnoho abiotických i biotických podnětů z vnějšího prostředí způsobuje depolarizaci plazmatické membrány. Dochází k ní za působení modré oblasti viditelného záření, hypoosmotického stresu, chladového stresu, Nod faktorů a různých elicitorů. Taktéž za přítomnosti Al^{3+} se mění transmembránový potenciál. Al^{3+} způsobuje depolarizaci PM spojenou s inhibicí H^+ ATPázy (Sivaguru *et al.*, 1999a; Rengel a Zhang, 2003). Vzhledem k tomu, že v přítomnosti Al^{3+} depolarizace nastává velmi rychle, mohla by právě ona spustit kaskádu událostí vedoucích k reorganizaci cytoskeletu (Sivaguru *et al.*, 1999a). Stejně tak inhibice či stimulace aktivit kanálů v membráně by mohla být příčinou hyperpolarizace či depolarizace díky změnám v tocích ostatních iontů, které se spolu s H^+ významně podílejí na udržování membránového potenciálu (Miyasaka *et al.*, 1989; Piñeros a Kochian, 2001; Ahn *et al.*, 2002). Sivaguru *et al.* (2003b) ukázali, že během působení Al^{3+} dochází k depolarizaci membrány, ale po zablokování glutamátém řízených Ca^{2+} kanálů v PM depolarizace za působení Al^{3+} nenastává. Z těchto výsledků můžeme usoudit, že Ca^{2+} kanály se podílí na přenosu signálu za působení Al^{3+} .

2.1.9 Hliník, ovlivnění pH v kořeni, iontové kanály

Kořen má na svém povrchu charakteristický profil pH. Na špičce je pH nižší než v DTZ, kde u kukuřice dosahuje hodnot 5,3, a za DTZ opět klesá. Aplikace Al^{3+} způsobuje vyrovnání hodnot podél kořene (Kollmeier *et al.*, 2000). Schopnost kořene udržovat zvýšené pH v rhizosféře byla navržena jako jeden z mechanismů rezistence k Al^{3+} (Miyasaka *et al.*, 1989).

Působením Al iontů dochází k výraznému poklesu aktivity H^+ ATPázy na PM, a následně klesá pH v cytosolu (Lindberg a Strid, 1997). Tolerantní rostliny jsou pravděpodobně schopny udržovat pH v cytoplazmě aktivací H^+ pumpy tonoplastu (Matsumoto, 2000).

Nesčetné studie se týkají vlivu Al^{3+} na K^+ kanály. Vlivem Al^{3+} byl inhibován K^+ kanál v kořenových vláscích bobu a kořenech kukuřice zajišťující pohyb K^+ do cytoplazmy (Liu a Luan, 2001; Piñeros a Kochian, 2001). Liu a Luan (2001) ukázali, že tento kanál je hliníkem blokován pouze z vnitřní, cytoplazmatické strany buňky. U sóji a pšenice byl taktéž zjištěn nižší obsah K v kořenových špičkách v důsledku působení Al^{3+} (Pavlovkin a Mistrík, 2001; Miyasaka *et al.*, 1989). Aktivita K^+ kanálů je však závislá na koncentraci Al^{3+} . Při vyšších koncentracích (80 μM AlCl_3) jsou u protoplastů z kořenové čepičky fazolu inhibovány, při nižších koncentracích (10 μM AlCl_3) jsou naopak K^+ kanály aktivovány a tok K^+ je mohutnější (Etherton *et al.*, 2004).

Al^{3+} aktivuje aniontový Cl^- kanál, a způsobuje tak vylití Cl^- z buňky (Piñeros a Kochian, 2001).

Tím, že Al^{3+} ovlivňuje iontové kanály a inhibuje příjem kationtů, narušuje rovnováhu živin v rostlinách (Lidon *et al.*, 1998).

2.1.10 Vztah Al^{3+} a Ca^{2+}

Al^{3+} narušuje tok mnoha iontů přes PM, jedním z nejdiskutovanějších témat však zůstává vliv Al^{3+} na tok Ca^{2+} iontů. Existuje hypotéza, podle které by veškeré změny vyvolané Al^{3+} měly být následkem porušené homeostáze Ca^{2+} v rostlinné cytoplazmě. Vzhledem k velkému významu Ca^{2+} v rostlinných signálních drahách (viz kap. 2.2.5) může mít ovlivnění jeho hladin vinou Al^{3+} dalekosáhlé dopady. Jedním z dopadů může být i blokování funkce kalmodulinu, významné signální molekuly, a narušení signálních kaskád, ve kterých kalmodulin vykonává svou funkci (viz výš).

Na jedné straně výsledky naznačují, že za působení Al^{3+} hladina Ca^{2+} v cytosolu dlouhodobě klesá a jsou blokovány Ca^{2+} propustné kanály na PM (Jones *et al.*, 1998).

U Al-senzitivního kultivaru pšenice byl příjem Ca^{2+} blokován při nižších koncentracích Al^{3+} než u Al-tolerantního kultivaru (Huang *et al.*, 1992). Al^{3+} inhibuje tok Ca^{2+} do rostlinných buněk, protoplastů i vezikulů. Stejně tak je inhibován hliníty ionty i transport Ca^{2+} z apikální části kořene dále do rostliny (Huang *et al.*, 1993).

Na druhé straně bylo pozorováno i zvýšení Ca^{2+} v cytoplazmě v buňkách kořenů pšenice (Bhuja *et al.*, 2004), protoplastech z kořenových špiček pšenice (Lindberg a Strid, 1997) a buněčných kulturách tabáku (Sivaguru *et al.*, 2005). Zhang *et al.* (2001) zjistili vyšší cytosolickou koncentraci Ca^{2+} v buňkách kořenového apexu u citlivějšího kultivaru pšenice (ES8) než u tolerantního (ET8). Hliníkem vyvolaný vzestup cytosolické koncentrace Ca^{2+} koreloval s inhibicí růstu kořene.

Zvýšené hladiny Ca v cytosolu mohou navíc souviset s již diskutovaným jevem ukládání kalózy. Proces ukládání kalózy, běžně pozorované jako reakce na Al působení, totiž vyžaduje zvýšenou hladinu Ca^{2+} (Sivaguru *et al.*, 2005).

Větší část Ca^{2+} se v kořenech přirozeně nachází v apoplastu, kde je potřebný ke stabilizaci plazmatické membrány a buněčné stěny. Al^{3+} vytěsňuje Ca^{2+} z jeho vazebných míst v apoplastu (Delhaize a Ryan, 1995) (viz výš).

2.1.11 Hliník a transport auxinu

Působením Al^{3+} došlo u kukuřice k inhibici bazipetálního transportu auxinů a k akumulaci auxinů v buňkách meristematické a přechodové zóny, čímž bylo negativně ovlivněno prodlužování buněk elongační zóny a potlačena gravitropická reakce (Kollmeier *et al.*, 2000). Také u smrku byl pozorován výrazný nárůst hladiny auxinů v kořenech (Čížková, 1995).

Inhibice bazipetálního transportu auxinu způsobuje natékání kořenových špiček z důvodu nekontrolovaného periklinálního dělení. Tyto účinky se velmi podobají změnám v kořenech vystavených působení Al^{3+} (Ruegger *et al.*, 1997). Je tedy možné, že primárním účinkem toxického působení Al^{3+} je inhibice transportu auxinů? Možné vysvětlení poskytuje práce Sivagurua *et al.* (2000). Autoři navrhují, že indukce tvorby kalózy v důsledku působení Al^{3+} může zapříčinit poruchy v transportu auxinových molekul a následnou inhibici růstu kořenů.

2.1.12 Benefiční vliv Al^{3+}

Ač se o hliníku mluví a píše většinou v záporném smyslu, je dokázáno, že v některých případech i na kulturní plodiny má vliv pozitivní. Je to především čajovník, u kterého má Al^{3+} v nízkých koncentracích kladný vliv na jeho růst (Matsumoto *et al.*,

1976). Růst semenáčků v přítomnosti vysokých koncentrací Al^{3+} byl zaznamenán i u *Melastoma malabathricum* (Watanabe a Osaki, 2001; Watanabe *et al.*, 2004).

2.1.13 Hliník a rostlina-citlivost či tolerance

Citlivost či tolerance je geneticky dána a liší se jednak mezi jednotlivými druhy rostlin (Malkanthi *et al.*, 1995), jednak mezi jednotlivými kultivary (Llugany *et al.*, 1995, Votrubová *et al.*, 1997) či dokonce klony pocházejícími z různých míst (Kidd a Proctor, 2000). Mezi citlivé druhy patří např. ječmen (*Hordeum vulgare*), pšenice (*Triticum aestivum*), čirok (*Sorghum bicolor*), sveřep (*Bromus benekenii*) a lipnice (*Poa pratensis*). Mezi středně citlivé druhy patří např. kukuřice (*Zea mays*), hrách (*Pisum sativum*), žito (*Secale cereale*), *Leucaena leucocephala*, *Ischaemum barbatum* a pohanka (*Fagopyrum esculentum*). Mezi tolerantní druhy řadíme např. rýži (*Oryza sativa*), metlici (*Deschampsia flexuosa*), smilku (*Nardus stricta*), šťovík (*Rumex acetosella*), břizu (*Betula pendula*) a čajovník (*Camellia sinensis*), dále např. *Melastoma malabathricum*, *Melaleuca cajuputi* a *Miconia albicans* (Andersson a Brunet, 1993, Kidd a Proctor, 2000, Watanabe a Osaki, 2001). Smrk (*Picea abies*) je též vůči Al^{3+} relativně tolerantní, neboť snáší koncentrace Al^{3+} 0,3mM bez poškození (Heim *et al.*, 1999).

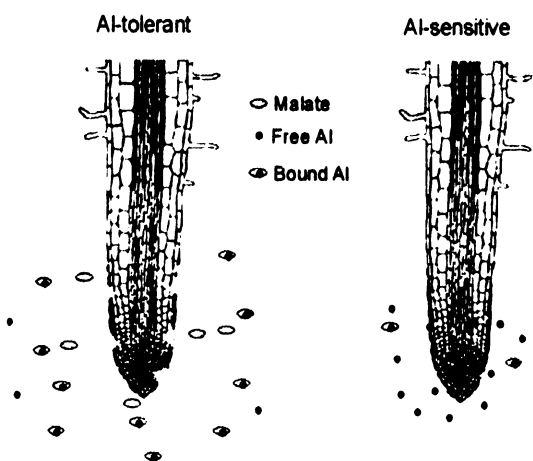
Al-tolerantní druhy rostlin, tedy takové druhy, které jsou schopné růst i na půdách s vyššími koncentracemi Al^{3+} , se obecně adaptovaly dvěma způsoby (Watanabe a Osaki, 2002):

a) Rostliny ukládají hliník v neškodné formě do vakuol, a zabraňují tak jeho interakci s cytosolickými složkami (tzv. aluminium accumulators). Rostliny, které takto hliník přijímají, jej akumulují v buňkách kořenů (*Vaccinium macrocarpon*, *Brachiaria ruziziensis*, *Polygonum sachalinense*) nebo v nadzemní biomase (*Rumex acetosella*, *Festuca rubra*) či v buňkách celého těla (*Camellia sinensis*, *Fagopyrum esculentum*, *Hydrangea macrophylla*). U rostlin akumulujících Al dochází k Al-indukované syntéze různých Al vázajících polypeptidů (thioniny, fytochelatiny), organických kyselin a transportních proteinů (ABC transportéry) (Čiamporová a Mistrík, 2001).

b) Buňky kořenů aktivně vylučují samotný hliník díky změnám v pH rhizosféry, redukci CEC (cation exchange capacity, kapacita vazby kationtů) BS a toku Al^{3+} ven z buněk přes PM. Další možností, jak se rostlina může vyhnout toxickému působení Al^{3+} , je vylučování organických kyselin, které váží Al ionty přímo v rhizosféře (tzv. aluminium excluders, např. *Oryza sativa*, *Melaleuca cajuputi*, *Acacia mangium*). S vylučovanými kyselinami tvoří hliník netoxické komplexy, a tím je zabráněno jeho dalšímu působení.

Organické kyseliny se schopností chelatovat Al ionty hrají významnou roli v detoxikaci Al^{3+} vně i uvnitř buňky (Ma, 2000). Zabraňují navázání Al^{3+} na vazebná místa v buněčné stěně a plazmatické membráně a tím udržují jejich normální funkci (Delhaize a Ryan, 1995). Přidání organických kyselin do živného roztoku zmírní toxicitu Al^{3+} (Tesfaye *et al.*, 2001).

Vylučování organických kyselin nastává specificky za působení Al^{3+} , jiné ionty než



Obr. 2.5 Vylučování organických kyselin jako reakce na působení Al^{3+} . www.plantstress.com/Articles/toxicity_m/Tolerance.htm

Al^{3+} ji nevyvolávají. Místo sekrece organických sloučenin odpovídá místu, kde Al^{3+} nejvíce působí, tedy kořenové špičce (Ma, 2000).

Byly popsány 2 typy vylučování. Během prvního jsou zřejmě aktivovány aniontové kanály a nastává ihned po dodání Al^{3+} . U druhého typu nastává vylučování až po časové prodlevě, jsou zřejmě nejprve exprimovány geny nutné pro vylučování organických kyselin (Ma, 2000). Různé druhy rostlin vylučují odlišné organické kyseliny.

Například sója, fazol, *Cassia tora* a senzitivní kultivar kukuřice vylučují kyselinu citrónovou (Silva *et al.*, 2001; Miyasaka *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2006, Kollmeier *et al.*, 2001) pohanka kyselinu šťavelovou (Zheng *et al.*, 1998; Ma a Hiradate, 2000). U žita a rýže byla zaznamenána exkrece jak malátu, tak citrátu (Li *et al.*, 2000, Macêdo *et al.*, 2001). Vylučování malátu v souvislosti s Al stresem z kořenové špičky se objevuje u pšenice (*Triticum aestivum* L.) a u tolerantního kultivaru kukuřice (Li *et al.*, 2000; Kollmeier *et al.*, 2001). Malát se vyskytuje jako dvojmocný aniont v cytoplazmě a jeho pohyb z buněk kořene je pasivní proces (Zhang *et al.*, 2001).

Aktivita enzymů (PEPkarboxylázy, malátdehydrogenázy a izocitrátdehydrogenázy), které se účastní jejich syntézy, však oproti senzitivním kultivarům zůstává nezměněna (Li *et al.*, 2000). Rozdíl je tedy spíše ve schopnosti transportovat je přes membránu (Delhaize a Ryan, 1995; Li *et al.*, 2000). Al^{3+} spouští otevírání malátových kanálů a kanálů pro kationty v membráně. Senzitivní a tolerantní kultivary se liší v množství Al^{3+} , které už je schopno malát-propustný kanál aktivovat. Také se liší v době, po kterou je kanál otevřen, a v množství vyloučené kyseliny.

Tolerantní kultivary vylučují více organické kyseliny po delší dobu. Exkrece malátového aniontu je doprovázena výdejem K^+ u tolerantního kultivaru pšenice (Zhang *et al.*, 2001).

U smrku jsou možnými ligandy hliníku fenolické sloučeniny a fosfáty. Není zde využívána exudace rozpustných organických kyselin. Ovšem po aplikaci Al^{3+} klesá množství fenolických sloučenin, které jsou za normálních okolností přítomny pouze v mikromolárních koncentracích. Zřejmě tedy nejsou součástí obranného mechanismu u smrku. Smrk je vůči Al^{3+} relativně tolerantní, snese koncentrace 0,3mM bez poškození. Letální koncentrace jsou až 30x vyšší. Je možné, že tu pozitivní roli hraje mykorrhiza (zadržování Al v kořenech stoupá po inokulaci smrku s *Paxillus involutus*) (Heim *et al.*, 1999).

2.2 Cytoskelet

Základními komponentami rostlinného cytoskeletu jsou aktinová filamenta (mikrofilamenta) a mikrotubuly (Goddard *et al.*, 1994). Pro buňku je cytoskelet velmi důležitý. Má strukturní a stavební, pohybovou a dopravní, ale i informační a signální funkci (Wasteneys, 2004; Breviario a Nick, 2000).

2.2.1 Aktinová mikrofilamenta

Aktin je jedním z pěti nejčastějších proteinů u eukaryot. Se svým sekvenčním rozdílem ne větším než 15% od řas až po člověka je zároveň jedním z nejkonzervovanějších proteinů. Je kódován skupinou genů, jejichž počet a rozložení v genomu je vysoce proměnlivé. Rostliny mají zpravidla vysoký počet genů pro aktin. Skoro všechny členy genové rodiny jsou exprimovány. Mechanizmy exprese aktinových genů a funkční rozdíly mezi aktinovými izoformami nejsou dosud známé.

Globulární monomer aktinu (G-aktin) je tvořen 375 aminokyselinami, má molekulovou hmotnost 43 kDa a je schopný vázat ATP. Sestavením trimeru vzniká jádro pro následující polymeraci. Polymerací aktinu za současného štěpení ATP vznikají řetězce s vláknitou šroubovicovou strukturou, mikrofilamenta, nazývaná též F-aktin. V buňce převažují aktinová filamenta, monomery se vyskytují pouze v komplexech s jinými regulačními proteiny zabráňujícími polymeraci. Mikrofilamenta jsou polární polymery o průměru 7 nm. Každé aktinové vlákno má (+) a (-)konec. Volný ATP-aktin se přednostně váže na jeho (+)konec. Následkem vazby hydrolyzuje ATP na ADP, čímž se zeslabí vazebná síla k sousedícím molekulám aktinu. ADP-aktin disociuje na (-)konci, z této strany je tedy aktinové vlákno zkracováno.

Je známo asi 70 proteinů asociovaných s aktinem. Některé se vyskytují na koncích filament a zabraňují nebo podporují jejich prodlužování či odbourávání. Jiné zabraňují či podporují polymeraci G-aktinu nebo způsobují rozpad F-aktinu. Příkladem je protein kofilin, který podporuje disociaci aktinu z (-)konce. Naproti tomu profilin podporuje zabudovávání aktinu na (+)konci. Další asociované proteiny zprostředkují boční interakce filament (např. fimbrin, α -aktinin), jiné je spojují s plazmatickou membránou (spektrin, vinkulin). Zvláštní skupinou jsou molekulové motory (myoziny) zajišťující transport nákladu po aktinových filamentech za současného štěpení ATP.

Aktinová filamenta prostupují cytoplazmu, kromě kortikální vrstvy a cytoplazmatických provazců se vyskytují v okolí jaderné membrány, kde tvoří aktinový košíček. V rostlinných buňkách plní mnoho důležitých funkcí. Cyklus jejich rozpadu zodpovídá za změny ve viskozitě cytoplazmy, účastní se přesunu organel v buňce, spolu s mikrotubuly kontrolují vytvoření dělicího vřeténka. V pylové láčce se účastní transportu a fúze vezikulů, při prodlužování vrcholové části přesunují organely, generativní buňku a vegetativní jádro. V plazmodezmech se podílejí na regulaci propojení symplastu.

2.2.2 Mikrotubuly

Základní stavební jednotkou mikrotubulů je vysoce konzervovaný tubulin, protein o 450 aminokyselinách a molekulové hmotnosti asi 100kDa. Je složen ze dvou globulárních podjednotek spojených nekovalentní vazbou, α (65kDa) a β -tubulinu (54 kDa). α -tubulin i β -tubulin mají vazebné místo pro GTP. V α -tubulinu je GTP přítomno neustále, u β -tubulinu může GTP hydrolyzovat na GDP.

C-konec tubulinového dimeru (β -tubulin) je tvořen α -helixy s kyselými aminokyselinami, které jsou v rámci mikrotubulu vystaveny na povrch. N-konec (α -tubulin) je bohatý na glycin a má charakter β -skládaného listu.

U *Arabidopsis* je v genomu kódováno 6 genů pro α -tubulin a 9 genů pro β -tubulin (Goddard *et al.*, 1994). Tyto dvě rodiny se oddělily brzy v evoluci od jednoho β -tubulinového předka a dvou odlišných prekurzorů α -tubulinových genů. Tubuliny tvoří různé izoformy, přičemž rozdíly se nacházejí převážně na C-konci. Posledních 15 aminokyselin je nejvariabilnějších a zodpovídá za 75% všech rozdílů. I jeden mikrotubul může být tvořen několika různými tubuliny (Breviario a Nick, 2000). Samozřejmě mohou být tubuliny, především však α -tubuliny, posttranslačně modifikovány glykozylací, tyrozinací, fosforylací, acetylací (Smertenko *et al.*, 1997). Modifikace mohou

následně měnit vlastnosti svazku mikrotubulů, např. snižovat jeho dynamiku nebo odolnost vůči chladu (Breviario a Nick, 2000).

Mikrotubuly jsou duté válce o vnějším průměru 25 nm a vnitřním průměru 14 nm. Heterodimery α a β -tubulinu nasedají na sebe v orientaci hlava-ocas a tvoří lineární protofilamenta, která asociují laterálně a dávají vznik levotočivé šroubovici. Jeden závit mikrotubulu je tvořen 13 protofilamenty. Jednotlivé mikrotubuly jsou dále spojeny pomocí proteinů asociujících s mikrotubuly (MAP) v mohutnější svazky (viz níže). Tvorba svazků je důležitou vlastností interfázových kortikálních mikrotubulů a preprofázového prstence (Dixit a Cyr, 2004).

Skládání a odbourávání MT vyžaduje vazbu a hydrolýzu GTP. Mikrotubuly vznikají polymerací tubulinových podjednotek obsahujících GTP, k hydrolýze GTP na GDP však dochází až po určité časové prodlevě. Tubulin s GTP tak vytváří na (+)konci MT čepičku. Velikost GTP čepičky může vést k různorodosti (+)konců z hlediska růstu mikrotubulu. V případě, že hydrolýza GTP přesáhne polymeraci tubulinu a dojde ke ztrátě GTP čepičky, mikrotubul se stává nestabilním a rychle depolymeruje (depolymerace MT je tak rychlý a dramatický jev, že je pro něj zaveden termín „katastrofa mikrotubulu“). Rychlost změn je u různých MT odlišná. Poločas rozpadu mikrotubulu může být v řádu několika minut i méně (Goddard *et al.*, 1994). U rostlin jsou interfázové mikrotubuly dynamičtější než u savců. Rychlost jejich prodlužování je nižší, zkracování je rychlejší. U rostlinných MT dochází méně často k repolymeraci MT po jejich depolymeraci. Rostlinné MT mají tedy rychlejší turnover polymerů (Dhonukshe a Gadella, 2003).

V rámci mikrotubulu je β -tubulinový konec rychleji rostoucí a více dynamický (+)konec, α -tubulinový konec (-)konec roste pomaleji a je méně dynamický. V případě, že je (-)konec ukotven, je dynamický pouze (+)konec a vykazuje periody růstu a zkracování se stochastickými přechody mezi těmito stavy. Za určitých podmínek může docházet k jednosměrnému růstu a tím i posouvání mikrotubulu (treadmilling) v prostoru (Goddard *et al.*, 1994; Dixit a Cyr, 2004) V případě, že jsou oba konce volně přístupné tubulinovým podjednotkám, odpovídá dynamika čisté polymeraci na plus konci a čisté depolymeraci na minus konci. Ke zkracování dochází v případě, že disociace dimerů od (-)konce přesáhne polymeraci na (+)konci. Frekvence výměn závisí na asociovaných proteinech, které ji mohou zvýšit či snížit (Breviario a Nick, 2000).

U rostlin růst mikrotubulu začíná na specifických místech v buňce, tzv. MTOC (mikrotubuly organizující centrum), přičemž mikrotubul je svým (-)koncem asociován

s MTOC. Při nukleaci mikrotubulu hraje roli γ -tubulin, vzdálený příbuzný α - a β -tubulinu, jenž zakládá prstenec prvních 13 dimerů. Po nukleaci a polymeraci tubulinu jsou mikrotubuly u (-)konce z MTOC uvolněny, zřejmě za pomoci AtKSS (*Arabidopsis thaliana* katanin-like protein small subunit, homolog p60 podjednotky kataninu), mikrotubuly štěpícího proteinu (McClinton *et al.*, 2001; Dixit a Cyr, 2004). Novější práce naznačují, že prstencový γ -tubulinový komplex je transportován podél mikrotubulu pomocí kinezinu směřujícího k (+)konci, a v určitém úhlu k předchozímu může začít polymerovat další mikrotubul (Murata *et al.*, 2005).

Dělicí vřetenko je mikrotubulární útvar vyskytující se u všech eukaryotních organismů. Rostliny mají navíc 3 unikátní mikrotubulární struktury účastnící se v buněčné morfogenezi, které nemají ekvivalentní struktury u buněk živočišných. Je to interfázové uspořádání mikrotubulárních svazků do kortikální vrstvy, které zřejmě určuje směr buněčné expanze (Smertenko *et al.*, 2000). Svazky kortikálních mikrotubulů mají různě orientované (+)konce mikrotubulů (Dhonukshe a Gadella, 2003). Dalšími typicky rostlinnými strukturami jsou předprofázový prstenec určující rovinu dělení buňky a fragmoplast, který směřuje váčky se stěnovým materiálem na místo buněčné desky (Smertenko *et al.*, 2000; Breviario a Nick, 2000).

Dlouho byla přijímána hypotéza, že kortikální mikrotubuly navigují celulózo-syntázový komplex v plazmatické membráně a určují tak orientaci celulózových mikrofibril v buněčné stěně. Mladší buňky s mikrofibrilami uspořádanými různě rostou do všech směrů v prostoru. Buňky starší, u kterých již nastalo prodlužování, rostou jen jedním směrem, poněvadž jsou omezeny jednosměrnou spirálovitou orientací celulózových mikrofibril. Celulózové mikrofibrily působí jako obruče, které buňce nedovolí se rozšiřovat. Buňka tak může zvětšovat svůj objem pouze ve směru kolmém na mikrofibrily.

Další studium ovšem odhalilo problematičnost tohoto tvrzení. Ukázalo se, že narušení kortikálních mikrotubulů vede k radiálnímu natékání buněk, ne vždy ale ke změně v uspořádání celulózových mikrofibril. Stejně tak narušení mikrofibril v určitých buňkách vede k jejich zpětnému transverzálnímu uspořádání i za absence transverzálního uspořádání kortikálních mikrotubulů (Himmelspach *et al.*, 2003; Wasteneys, 2004). Roli mikrotubulů a uspořádání celulózních mikrofibril v růstu buněk bude tudíž třeba ještě lépe objasnit.

2.2.3 Proteiny asociované s mikrotubuly (MAP)

Rostlinné MAP jsou důležité pro modulaci funkce mikrotubulárního cytoskeletu. Přestože jich bylo již popsáno mnoho, bezpochyby ještě další čekají na objevení vzhledem ke komplexitě rostlinného mikrotubulárního cytoskeletu a jeho odpovědím na podněty z vnitřního i vnějšího prostředí rostliny (Gardiner a Marc, 2003). Na základě databázového vyhledávání bylo v *Arabidopsis thaliana* zjištěno 14 homologů modelových MAP z ostatních taxonů, přičemž homologní domény byly z 57,1-97,0% homologní s modelovou MAP sekvencí, z 22,5-72,8% byly aminokyselinové zbytky identické a ze 76,3-96,2% si proteiny zachovávaly stejnou sekundární strukturu v homologní doméně (Gardiner a Marc, 2003).

Tyto proteiny jsou účastníky mnoha dějů, včetně správného utváření trojrozměrné struktury tubulinu, nukleace mikrotubulů, dynamiky polymerace, dále se podílí na ukotvení mikrotubulů v plazmatické membráně, interakcích s proteinovými komplexy PM a dalšími proteiny, vytváření spojnůk mezi mikrotubuly, kontroly buněčného cyklu v závislosti na mikrotubulech (Gardiner a Marc, 2003; Hussey *et al.*, 2002).

Z MAP, které byly identifikovány, jmenujme TANGLED1, SPIRAL1, cytosolický chaperonin obsahující komplex (cytosolic chaperonin-containing complex (CCT)), homolog podjednotky p60 kataninu AtKTN1, dále heat shock protein 90, protein vázající se ke koncům MT AtEB1a a elongační faktor 1 α . Z tabáku, mrkve a huseníčku bylo izolováno mnoho kinezinů (Asada *et al.*, 1997; Oppenheimer *et al.*, 1997; Barroso *et al.*, 2000). Nedávno byly u rostlin identifikovány též dyneiny. Tobacco virus movement protein (TMV) taktéž asociuje s mikrotubuly (Heinlein *et al.*, 1995). Fosfolipáza D (90kD) se váže na mikrotubuly i plazmatickou membránu, k membráně je uchycena nezávisle na MT. Teoreticky by mohla zprostředkovávat signály hormonální i z vnějšího prostředí mikrotubulům (Gardiner *et al.*, 2001).

Strukturální MAP podporují polymeraci a depolymeraci, spojují MT s AF, svazují mikrotubuly v paralelní svazky a tyto svazky spojují s membránami, vezikuly a ER (Hussey *et al.*, 2002). Jsou to např. MAP65, MAP120, MAP190, microtubule organization 1 (MOR1) a elongační faktor 1 α . Byly izolovány např. z BY-2 a mrkve (Jiang a Sonobe, 1993; Chan *et al.*, 1999).

MAP mohou být regulovány posttranslačními modifikacemi, např. fosforylací, v závislosti na níž se mění afinita MAP k MT, a může tak způsobit změny v jejich dynamice a uspořádání (Preuss *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1998; Hussey *et al.*, 2002).

Nyní se krátce vraťme k nejdůležitějším proteinům asociovaným s mikrotubuly.

Vysoce zásaditý mikrotubuly vázající protein TANGLED1 (TAN1) se vyskytuje v dělicích se buňkách, kde hraje klíčovou roli v determinaci roviny dělení. Je nezbytný jak pro uspořádání cytoskeletálních svazků určujících roviny dělení během profáze, tak pro navigaci rostoucích fragmoplastů k předurčeným místům dělení v cytokinezi. Jeho nepřítomnost vede u kukuřice ke špatné orientaci fragmoplastu a špatným pozicím buněčných stěn (Cleary a Smith, 1998; Smith *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2006).

TAN1 interaguje s kineziny, jež sdílí homologii s dvěma geny pro kinezin-12: fragmoplast orientující kinezin 1 a 2 (POK1, POK2) (phragmoplast orienting kinesin 1 and 2). Autoři navrhují, že POK1 a POK2 se účastní kontroly prostorového uspořádání cytokineze zřejmě díky interakci s proteinem TAN1 (Müller *et al.*, 2006).

Protein SPIRAL1 (SPR1) je malý (12kDa) protein specifický pro rostliny, který se zřejmě podílí na kontrole anizotropního růstu rostlinných buněk díky svým oběma konzervovaným terminálním doménám (N- i C-). Patří do šestičlenné genové rodiny v *Arabidopsis*. Kolokalizuje s kortikálními mikrotubuly, preprofázovým prstencem, fragmoplastem i mitotickým vřeténkem. Díky SPR1:GFP fúzi byla odhalena jeho přednostní přítomnost na rostoucích koncích mikrotubulů. Za stavu, kdy se mikrotubuly zkracovaly, se SPR1 od nich oddělil (Nakajima *et al.*, 2004; Sedbrook *et al.*, 2004)

Silná exprese SPR1 byla zaznamenána v pletivech s rychle se prodlužujícími buňkami. Rostliny s nadměrnou expresí SPR1 byly odolnější vůči mikrotubulárním drogám a měly delší hypokotyly. Naopak *spr1* mutantní *Arabidopsis* stáčí své kořeny a hypokotyly do pravotočivé spirály. SPR1 je tedy zřejmě nezbytný pro udržení anizotropie v rychle se prodlužujících buňkách (Nakajima *et al.*, 2004).

Mutanty *spiral2/tortifolia1 (spr2/tor1)* také vykazují pravotočivost, která souvisí s reorientací kortikálních mikrotubulů. Analýza proteinu TOR1 ukázala, že se jedná o člena nové rodiny proteinů specifických pro rostliny. Proteiny této rodiny obsahují N-terminální HEAT repetici. Rekombinantní TOR1 kolokalizuje s kortikálními mikrotubuly a přímo se na ně váže *in vitro*. Z poznatků vyplývá, že TOR1 je nový, pro rostliny specifický protein asociující s mikrotubuly (MAP), jenž reguluje orientaci kortikálních mikrotubulů a směr růstu rostlinných orgánů (Buschmann *et al.*, 2004).

Protein se specifickou funkcí štěpení mikrotubulů je AtKTN1 (*Arabidopsis thaliana* katanin), někdy nazývaný FRA2. U mutantů *fra2* (fragile fiber) se v souladu s jeho funkcí opoždíje mizení perinukleárních mikrotubulárních svazků a ustanovení transverzálních kortikálních mikrotubulů během interfáze v prodlužujících se buňkách. Je tak narušeno prodlužování buněk a kortikální mikrotubuly vykazují narušenou orientaci (Burk *et al.*, 2001; Burk a Ye, 2002).

Jedním z dalších MAP je protein vázající se ke koncům mikrotubulů AtEB1a (microtubule end binding protein 1a). Během interfáze je lokalizován jak u (+), tak u (-)konců, které jsou v buňce pohyblivé. Během cytokineze už nebyl zaznamenán tento roztroušený výskyt, nýbrž plus konce byly asociovány s jadernou membránou. Signál AtEB1a-GFP připomínal kometu a značený materiál na povrchu jádra se posléze rozdělil do dvou polárních čepiček kolmo na preprofázový prstenec. Zřejmě hraje důležitou roli při rychlém růstu (+)konce mikrotubulu (Chan *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2005).

Elongační faktor 1 α (EF-1 α) (elongation factor-1 α) má molekulovou hmotnost 50kDa. Jeho homolog je přítomen ve všech organizmech a je nezbytný pro translaci proteinů. EF-1 α váže, svazkuje, stabilizuje a podporuje polymeraci MT *in vitro*. Aktivita svazkování MT je ovlivňována Ca²⁺/kalmodulem (Durso a Cyr, 1994).

Byly identifikovány dvě domény zodpovídající za vazbu s mikrotubuly. Jedna v N-terminální doméně I, druhá v C-terminální doméně III. Doména III stabilizuje kortikální MT, které jsou v její přítomnosti odolné i vůči oryzalinu. Doména I zřejmě negativně ovlivňuje vazbu celého EF-1 α na MT *in vivo* (Moore a Cyr, 2000).

Kineziny, rodina molekulárních motorů, využívají mikrotubuly jako dopravní stezky pro jednosměrný transport rozličného nákladu (např. váčků, organel, RNA nebo proteinových komplexů) v rámci buňky. Z tohoto důvodu hrají významnou úlohu v mitóze, meióze, kontrole dynamiky MT a přenášení signálu. Energie potřebná k transportu vzniká štěpením ATP. Všechny kineziny obsahují vysoce konzervovanou MT vazebnou motorovou doménu čítající zhruba 350 aminokyselin. Motorová doména může být nejčastěji umístěna na N-konci, popřípadě na C-konci nebo interně v proteinu. Kineziny s motorovou doménou na C-konci přepravují náklad směrem k minus konci MT, kineziny s motorovou doménou na N-konci přepravují náklad směrem k plus konci MT. Krátký krček přilehlý k motorové doméně proteinu většinou skrývá specifické vlastnosti rodiny.

Mnoho kinezinů má dále méně konzervovanou coiled-coil strukturu, jež je důležitá pro dimerizaci, a nekonzervovaný ocas, který je zodpovědný za interakci s nákladem.

Je známo 14 rodin kinezinů, přičemž u vyšších rostlin se nepředpokládá přítomnost všech rodin, 3-4 zřejmě chybí. Analýzy genomu *Arabidopsis* odhalily přítomnost a umožnily identifikovat 61 kinezinů. Nejméně 23 se jich účastní procesů spojených s mitózou. Některé kineziny jsou přítomny ve fragmoplastu a kontrolují dynamiku tvorby buněčné desky. Překvapivě málo kinezinů je asociováno s mitotickým vřeténkem a preprofázovým prstencem (Reddy a Day, 2001; Richardson *et al.*, 2006; Vanstraelen *et al.*, 2006).

Kineziny byly poprvé u rostlin identifikovány v pylových láčkách (pollen kinesin homologue, PKH) a fragmoplastu tabáku (tobacco kinesin related protein, NtKRP125). Dále byly charakterizovány kineziny v *Arabidopsis*, bramboru, mrkvi, rýži a kukuřici. Příkladem je kinezin AtPAKRP1. Tento kinezin se začal akumulovat podél mikrotubulů směrem ke střední rovině vřeténka během pozdní anafáze a přetrval během telofáze a cytokineze. Ve chvíli, kdy byl přítomný fragmoplast, se kinezin soustředil na MT v místě budoucí buněčné desky (Lee a Liu, 2000).

Některé další kineziny mají specifické funkce, např. jsou významné pro správné ukládání celulósových mikrofibril (AtFRA1) nebo hrají roli v morfogenezi trichomů (ZWI) (Oppenheimer *et al.*, 1997). GhKCHI, člen rodiny kinezinů 14 z bavlny, má z hlediska budoucího výzkumu slibnou vlastnost. Jedná se o kinezin zprostředkující dynamickou interakci mezi mikrofilamenty a mikrotubuly (Preuss *et al.*, 2004).

Protein MOR1 (microtubule organization) o relativní molekulové hmotnosti 217,000 byl identifikován v *Arabidopsis thaliana*. Jeví sekvenční podobnost s lidským TOGp⁷ a MAP215 z drápatky (*Xenopus*). Obsahuje nejméně deset HEAT repeticí, které se účastní při interakcích proteinů (Whittington *et al.*, 2001). Homolog MOR1/XMAP215 o molekulové hmotnosti 200 kDa (TMBP200) byl také izolován z buněčné kultury tabáku BY-2 (Hamada *et al.*, 2004). MOR1 reguluje organizaci a funkci kortikálních mikrotubulů. Tvoří komplexy s tubulinem, podporuje jeho polymeraci a zvyšuje počet i délku mikrotubulů. Během buněčného cyklu kolokalizuje s mikrotubulárními strukturami včetně interfázových kortikálních MT, preprofázového prstence, vřeténka i fragmoplastu. Zároveň je přítomen i v místech bez MT. *Mor-1* mutanty *Arabidopsis thaliana* měly narušené preprofázové prstence, dělicí vřeténka a fragmoplasty, v polovině buněk nebyl předprofázový prsteneček vůbec nalezen. Vřeténko i fragmoplast byly kratší, zřejmě vinou

kraších MT, nebyly normálně uspořádané a přetrvávaly v buňkách déle než u divokého typu. Tyto změny vedly k nesprávnému rozdělení chromozómů, špatně utvořeným či neúplným buněčným deskám a mnohjaderným buňkám (Hamada *et al.*, 2004, Kawamura *et al.*, 2006).

2.2.3.1 MAP65 a jejich role v rostlinné buňce

Rodina proteinů MAP65 plní v rostlinách velmi důležitou funkci. Tyto proteiny se vážou a tvoří můstky mezi jednotlivými mikrotubuly. Spojují je tak do silnějších, mohutnějších svazků. Pomocí imunofluorescence byli členové rodiny MAP65 nalezeni na všech mikrotubulech v buňce (Jiang a Sonobe, 1993). Můžeme se domnívat, že proteiny MAP65 rodiny hrají významnou úlohu za působení Al^{3+} z několika důvodů. Jednak vzhledem k tomu, že po 1 hodině působení Al^{3+} iontů bylo zjištěno ztenčování mikrotubulárních svazků za současného zvýšení jejich počtu (Schwarzerová *et al.*, 2002), jednak zároveň existuje studie o výrazném efektu Al^{3+} na mikrotubuly vazebnou doménu (MBD, microtubule binding domain) lidského MAP4 proteinu. Tato doména fúzovaná s GFP proteinem a exprimovaná v *Arabidopsis thaliana* jevila za působení Al^{3+} výraznou reorganizaci. Za normálních podmínek se signál MBD velmi podobal uspořádání kortikálních mikrotubulů, oproti tomu po 30 minutách působení Al^{3+} docházelo k fragmentaci signálu. Autoři jev interpretují jako doklad o depolymeraci mikrotubulů (Sivaguru *et al.*, 2003b). Na základě těchto předpokladů jsme pro své experimenty zvolili protein MAP65-1, jelikož se váže mj. na interfázové kortikální mikrotubuly a svými dimery je spojuje v mohutnější svazky.

Rodina proteinů asociovaných s mikrotubuly nazvaná MAP65 (dle přibližné molekulové hmotnosti) je unikátní u rostlin (Wasteneys, 2002) a zároveň je u nich rodinou nejhojnějších MAP (Smertenko *et al.*, 2004). Odvozená aminokyselinová sekvence MAP65 genů nevykazuje signifikantní identitu s ostatními známými MAP. Vykazuje ovšem homologii s některými jinými proteiny. Ase1 ze *Saccharomyces cerevisiae* (anaphase spindle elongation factor; Pellman *et al.*, 1995) a protein regulující cytokinezi u obratlovců (PRC1, protein regulating cytokinesis 1; Jiang *et al.*, 1998) ukazují 16-18% identitu s NtMAP65-1 (Hussey *et al.*, 2002).

U *Arabidopsis* je rodina MAP65 tvořena 9 MAP65 geny (AtMAP65-1 do AtMAP65-9). Jejich předpokládaná molekulová hmotnost je 54-80 kDa (Smertenko *et al.*, 2004).

Proteiny MAP65 plní v rostlinné buňce různé specifické funkce (Mao *et al.*, 2005). Unikátní role byla například odhalena u proteinu AtMAP65-3/PLEIADE, když záměna Val za Ala420 zabránila cytokinezi vinou změny uspořádání mikrotubulů ve fragmoplastu (Müller *et al.*, 2004). AtMAP65-4 asociuje s přeuspořádanými mikrotubuly na pólech buňky, v místech, kde se bude tvořit mitotické vřeténko. Také jeho exprese byla největší v mitóze, což dokládá, že se podílí na tvorbě mitotického vřeténka (Van Damme *et al.*, 2004)

In vitro byla také ukázána odlišná funkce AtMAP65-6 a AtMAP65-1. Ačkoli se oba váží na mikrotubuly, AtMAP65-6 nevykazuje žádnou podpůrnou aktivitu v polymeraci tubulinu a stabilizaci nově vzniklých tubulů. Za přítomnosti AtMAP65-6 tvořily mikrotubuly velmi hustou síť s různě orientovanými jednotlivými mikrotubuly. Netvořily se jejich svazky a spojovací můstky mezi mikrotubuly se objevily pouze lokálně. Navíc se po použití protilátky ukázalo, že AtMAP65-6 je asociovaný s mitochondriemi a umožňuje jejich interakci s mikrotubuly (Mao *et al.*, 2005).

2.2.3.1.1 MAP65-1

AtMAP65-1 vykazuje 86% podobnost s MAP65-1 z tabáku (NtMAP65-1) (Smertenko *et al.*, 2000). Předpokladaný čtecí rámec kóduje 587 aminokyselinový protein o molekulární hmotnosti 65,8 kDa.

Smertenko *et al.* (2004) ukázali, že homodimery AtMAP65-1 tvoří 25nm můstky

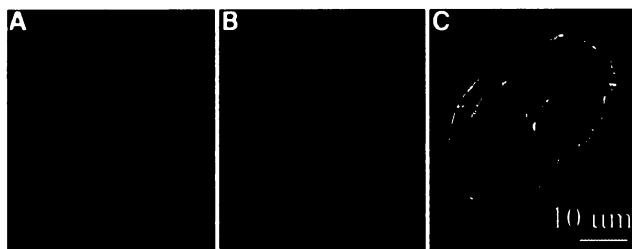


Obr. 2.6 MAP65-1 tvoří 25nm spojníky mezi mikrotubuly (Smertenko *et al.*, 2004)

mezi jednotlivými paralelními mikrotubuly po celé jejich délce, a spojují je tak v mohutné

svazky čítající více než 12 mikrotubulů (Smertenko *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2005). Neurychluje ani nezabraňuje katastrofě MT (Smertenko *et al.*, 2004). Na základě pozorování mizení signálu proteinů po působení laserového světelného paprsku laseru u GFP exprimujících linií bylo po zjištění rychlejší obnovy MAP65-1 než tubulinu. Jeho turnover je 4-5x rychlejší než „treadmilling“ MT (13 s oproti 56s) (Chang *et al.*, 2005). Není na něm závislý, je to samostatný proces. Dle Mao *et al.* (2005) AtMAP65-1 navíc

podporuje polymeraci mikrotubulů *in vitro* (ačkoli Smertenko *et al.* (2004) tvrdí opak), zvyšuje nukleaci mikrotubulů a snižuje kritickou koncentraci tubulinu pro jeho polymeraci (Mao *et al.*, 2005). MAP65-1 má vazebné místo pro mikrotubuly na C-konci, na N-konci se nachází vazebné místo pro druhý monomer MAP65-1. Pouze antiparalelní uspořádání umožňuje spojovat mikrotubuly (Smertenko *et al.*, 2004). Esenciální pro interakci mikrotubuly jsou Ala409 a Ala 420. Ala420 je v rámci rodiny AtMAP65 konzervovaná



Obr. 2.7 Kolokalizace mikrotubulů s AtMAP65-1 v protoplastech *Arabidopsis thaliana* (Smertenko *et al.*, 2004)

aminokyselina. Její mutace na Val u mutanty *pleiade-4* (viz výš) je příčinou chybné cytokineze (Müller *et al.*, 2004; Smertenko *et al.*, 2004). AtMAP65-1 je exprimován ve všech rostlinných pletivech a orgánech s výjimkou kališních lístků a prašníků

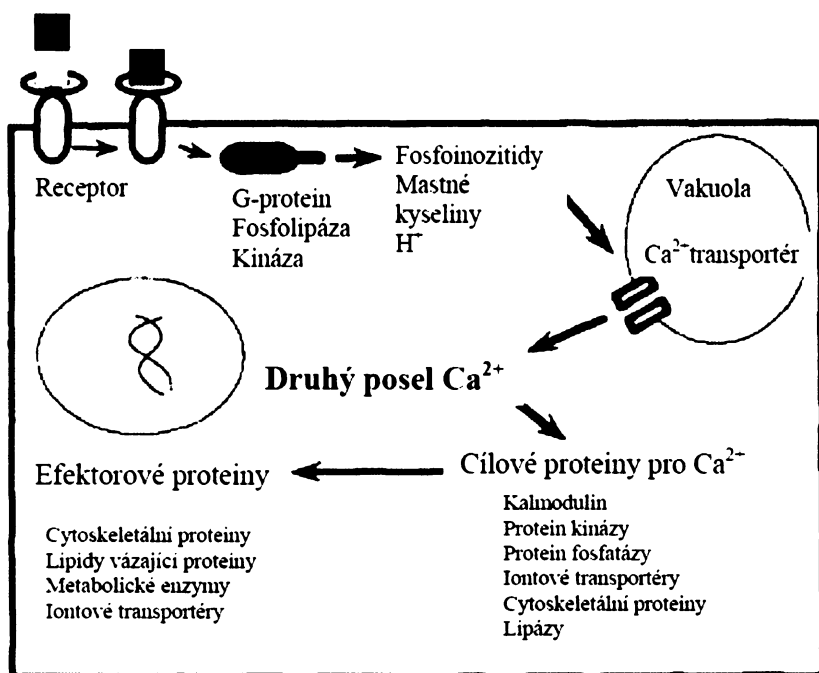
(Smertenko *et al.*, 2004). AtMAP65-1 se váže na mikrotubuly pouze v určitých fázích buněčného cyklu, jeho aktivita je tedy nejspíš kontrolována posttranskripčně. Během interfáze se váže na kortikální MT. Dále je lokalizován na preprofázovém prstenci, na anafázním vřeténku v místě překrývajících se MT a ve střední zóně fragmoplastu, kam MT dopravují váčky s materiálem pro buněčnou desku (Smertenko *et al.*, 2004).

U tabáku rodinu NtMAP65-1 tvoří tři podobné proteiny, NtMAP65-1a, NtMAP65-1b, NtMAP65-1c. NtMAP65-1 se neváže na porušené a fragmentované mikrotubuly, ovšem po jejich zpětném obnovení s nimi opět asociuje. Nepodporuje tedy zahájení jejich polymerace (Smertenko *et al.*, 2000).

2.2.4 Signalizace v buňce-obecný přehled

Signální dráhy v buňce fungují jako řada molekulových prepínačů, mezi nimiž je signál přenášen formou signální molekuly. Signální molekula po vazbě na svůj specifický receptor změní jeho konformaci, díky čemuž může receptor generovat další signály v buňce. Koncentrace signálních molekul je velice nízká, ale jejich vazba na receptor velice rychlá a silná. Receptorový protein na povrchu buňky převádí extracelulární signál na intracelulární, přičemž zahajuje signální kaskádu. Tato kaskáda signál cestou zesílí a rozdělí do různých směrů (např. na změny v cytoskeletu, regulaci genové exprese a regulaci metabolické dráhy). Řada kroků takové kaskády může být ovlivněna jinými pochody v buňce.

Na povrchu rostlinných buněk se vyskytují převážně dva typy receptorů. V první řadě jsou to receptory spojené s iontovými kanály, ve druhé pak receptory spojené s G-proteiny. Liší se mezi sebou podstatou signálu, který vytvářejí uvnitř buňky. Receptory



Obr. 2.8 Zjednodušené schéma signálních drah zahrnujících receptory spojené s G-proteiny v rostlinných buňkách. Převzato z Bushe, 1993

spojené s iontovými kanály po navázání signální molekuly převádějí chemický signál na elektrický, neboť se změnou své konformace otevírají či zavírají kanál pro průtok specifických iontů přes membránu.

Receptory spojené s G-proteiny po navázání signální molekuly nejprve předají signál GTP-vázajícímu

proteinu (G-proteinu), který se spojí s receptorem a dojde k výměně GDP za GTP v jeho α -podjednotce. To způsobí rozdělení G-proteinu na aktivovanou α -podjednotku a samostatný komplex $\beta\gamma$. Obě aktivované části G-proteinu mohou difundovat v rovině plazmatické membrány a vyvolávat kaskádu dalších pochodů. Některé G-proteiny regulují iontové kanály, jiné aktivují enzymy vázané v membráně. Nejčastějším cílovým enzymem G-proteinů je fosfolipáza C. Působí na membránový inozitolový fosfolipid (fosfatidyl inozitol-4,5-bisfosfát) a vytváří dvě různé mediátorové molekuly. Odštěpuje inozitol-1,4,5-trisfosfát (IP_3), zatímco lipidový konec diacylglycerol (DAG) zůstává zanořený v plazmatické membráně. IP_3 putuje cytosolem a po dosažení endoplazmatického retikula či vakuoly otevírá Ca^{2+} kanály v membráně, potažmo tonoplastu. Zvyšuje se tak výrazně koncentrace Ca^{2+} v cytosolu. DAG v plazmatické membráně mezitím spolu s Ca^{2+} aktivuje proteinkinázu C. Proteinkináza C fosforyluje aminokyseliny Ser a Thr v souboru intracelulárních proteinů, které jsou zapojeny do regulace transkripce.

Zvýšená hladina Ca^{2+} v cytosolu rostlin může být generována jednak IP_3 , jednak cyklickou ADPribózou (cADPR), která otevírá Ca^{2+} kanály na tonoplastu a membráně ER (Reddy, 2001) a je odpovědí na mnoho různých signálů, nejen na ty, které působí

prostřednictvím G-proteinů. Účinky Ca^{2+} jsou většinou zprostředkovány Ca^{2+} -vázejícími proteiny. Nejdůležitějším je kalmodulin, malá 17kDa molekula s celkem čtyřmi Ca^{2+} -vazebnými místy na svých dvou globulárních koncích. Po navázání čtyř Ca^{2+} mění kalmodulin svou konformaci, a může se tudíž vázat na řadu cílových proteinů zahrnutých ve fyziologických procesech a měnit jejich aktivitu. Příkladem jsou na kalmodulinu závislé proteinkinázy (CaM-kinázy), které následně ovlivňují řadu buněčných dějů fosforylací v serinových a threoninových postranních řetězcích proteinů.

Kalmodulin se podílí na Ca^{2+} závislých odpovědích za působení různých stresorů, např. při působení těžkých kovů. Dále se váže i na řadu proteinů spojených s fosfolipidovou signalizací, reorganizací cytoskeletu a buněčným dělením. Jeho různé izoformy přenášejí specifické vývojové signály i signály z vnějšího prostředí. Různé podněty z vnějšího prostředí zvyšují expresi jeho různých izoform (White a Broadley, 2003).

2.2.5 Role vápníku v rostlinách coby přenašeče signálu

Na Ca^{2+} v rostlinné buňce je třeba se zaměřit hned z několika důvodů. Ca^{2+} je významný druhý posel v signálních drahách u rostlin, včetně drah ovlivňujících cytoskelet. Změny v jeho cytosolické koncentraci jsou způsobeny mj. i Al^{3+} ionty (Zhang a Rengel, 1999). Navíc samotný Ca^{2+} destabilizuje mikrotubuly (Breviaro a Nick, 2000) a působí zřejmě i na proteiny asociované s mikrotubuly. Sivaguru *et al.* (2003b) ukázali jeho vliv na doménu asociovanou s mikrotubuly (MBD) z lidského MAP4. Za normálních okolností tato doména kolokalizovala s kortikálními mikrotubuly, po aplikaci Ca^{2+} se její signál stal fragmentovaným a svým vzhledem napodoboval depolymeraci mikrotubulů. Je možné, že Al^{3+} vstupuje v rostlinné buňce do signálních drah Ca^{2+} a narušuje jejich správný průběh či průběh vůbec.

Kromě Ca^{2+} fungují jako přenašeče v rostlinných signálních drahách lipidy, pH a cyklické GMP (cGMP). Nicméně volné cytosolické Ca^{2+} jsou bezesporu nejdůležitější a nejvíce využívané (Sanders *et al.*, 1999). Transportní systémy na odstraňování Ca^{2+} z cytosolu jsou přítomny ve všech buňkách za účelem udržet jeho cytosolickou koncentraci na stálých submikromolárních hodnotách. Vysoká cytosolická koncentrace Ca^{2+} je pro buňku toxická, souvisí s apoptózou během normálního vývoje rostlinného organismu (White a Broadley, 2003). Koncentrace volných Ca^{2+} je v cytosolu nízká již z toho důvodu, že většina Ca^{2+} vstupujícího při signalizaci do cytosolu je velmi rychle vázána díky své

vysoké afinitě k řadě vazebných proteinů. Nejvýznamnější z vazebných proteinů je kalmodulin, který slouží jako přenašeč signálu, protože se dále váže na jiné molekuly (Sanders *et al.*, 1999). Nadbytečný Ca^{2+} musí být z cytosolu odstraněn buď do vakuoly, endoplazmatického retikula, mitochondrií, a dokonce i chloroplastů (Bush, 1993), nebo se transportuje přes PM do apoplastu. Tím vzniká rozdíl elektrochemických potenciálů na membránách. Poměr koncentrací Ca^{2+} uvnitř a vně buňky je v řádu 10^{-4} (Sanders *et al.*, 1999). Transport z cytosolu zajišťují pumpy poháněné hydrolýzou ATP nebo protonovým gradientem. Tyto pumpy mohou být aktivovány kromě jiných cytoplazmatických signálů přímo Ca^{2+} nebo kalmodulinem. Pasivní vstup Ca^{2+} do cytosolu je zprostředkován iontovými kanály (Sanders *et al.*, 1999). Hlavní funkce Ca^{2+} kanálů v plazmatické membráně spočívá v buněčné signalizaci (White, 1998). Kanály můžeme rozčlenit na kanály nezávislé na napětí, hyperpolarizací aktivovatelné kanály a depolarizací aktivovatelné kanály (White, 2000, White a Broadley, 2003). Předpokládá se, že depolarizací aktivovatelné kanály jsou zahrnuty všeobecně do signalizace spojené se stresem, jelikož depolarizace je běžná reakce na mnoho podnětů a způsobuje na buněčné periférii zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} (White, 1998). K depolarizaci membrány dochází již během jedné minuty působení podnětu (Sanders *et al.*, 1999). Předpokládá se, že je spojena s prvotní aktivací aniontových kanálů (Cho a Spalding, 1996; White, 1998). Výsledný vzrůst aktivity Ca^{2+} kanálů může usnadnit zvýšení koncentrace cytosolických Ca^{2+} . Zřejmě jsou ale pro spuštění signálu potřeba ještě další regulátory. Například činnost dominantních depolarizací aktivovaných kanálů v protoplastech mrkve je řízena přímými či nepřímými interakcemi s mikrotubuly. Za normálního stavu mikrotubulární síť je činnost vápenatých kanálů potlačena. Za působení oryzalinu, který depolymeruje mikrotubuly, stoupá v polovičním čase aktivita vápenatých kanálů šestkrát až desetkrát. Působení taxolu, mikrotubuly stabilizující drogy, nemá na aktivitu kanálů žádný vliv (Thion *et al.*, 1996).

Typ, buněčná lokalizace a hustota kanálů ovlivňuje prostorový charakter změn vyvolaných Ca^{2+} . Otevření Ca^{2+} kanálu způsobí místní zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), které ovšem rychle zmizí poté, co se kanál zavře. Tak jsou ovlivněny biochemické procesy na specifickém místě v buňce. Změny v $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ musí mít buď nízkou amplitudu, nebo musí být dočasné, tranzientní (White a Broadley, 2003). Tento stav má totiž pro buňku úplně jiný význam než výše zmíněná neustále zvýšená cytotoxická $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Tranzientní zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ může být jednoduché, dvojité nebo může vykazovat oscilaci (Evans *et al.*, 2001). Doba trvání, periodičita a amplituda $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscilací je velmi

variabilní a jejich forma je často závislá na síle a kombinaci specifických stimulů (Evans *et al.*, 2001). Různé stresory způsobují tedy různé podoby Ca^{2+} signálu. Liší se i místo v buňce, kde se začne $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ měnit (Sanders *et al.*, 1999). Rostlina má tak šanci rozpoznat, co na ni působí, a specificky reagovat. Specifické $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signalizace mají specifické biochemické i genetické následky (White a Broadley, 2003).

Aby rostlina „odpověděla správně“ na specifickou změnu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, musí aktivovat jedinečnou kombinaci Ca^{2+} vazebných proteinů. Tyto senzory $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ zahrnují kalmodulin, kalmodulinu podobné proteiny (CaM-like proteins) a na Ca^{2+} závislé kinázy (Ca^{2+} -dependent protein kinases, CDPKs). Po navázání Ca^{2+} se mění jejich vlastnosti a mohou tak reagovat s dalšími či cílovými proteiny. Fyziologická odpověď tedy závisí nejen na charakteru změny $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, ale i na expresi Ca^{2+} vazebných proteinů, jejich afinitě k Ca^{2+} a k cílovým proteinům a na hustotě a aktivitě cílových proteinů (White a Broadley, 2003).

Mnoho CDPK je funkčně asociováno s cytoskeletem a může fosforylovat cílové proteiny, mj. i cytoskeletální (Reddy, 2001; Sanders *et al.*, 2002).

Také PLD, která je zahrnuta do mnoha buněčných signálních drah, je schopna vázat přímo Ca^{2+} a její aktivita je regulována $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Wang *et al.*, 2000; White a Broadley, 2003).

Je vidět, že rostlinný systém signalizace pomocí Ca^{2+} je velmi spletitý.

2.2.6 Mikrotubuly a signalizace v buňce

Mikrotubuly jsou pro rostlinu významné nejen z hlediska morfogenetického, ale účastní se i odpovědí na biotický a abiotický stres (Breviario a Nick, 2000). Řada intracelulárních, extracelulárních, hormonálních signálů a signálů z vnějšího prostředí indukuje reorganizaci cytoskeletu (Wasteneys a Yang, 2004). Reorganizace cytoskeletu je zahrnuta mezi rané reakce na abiotický a biotický stres spolu se změnami membránového potenciálu a cytosolické koncentrace druhých posílů (Thion *et al.*, 1996). Reorganizace nebo depolymerace může znamenat, že proteiny asociované na povrchu MT jsou uvolněny, možná aktivovány a působí tak na jiné cílové molekuly. V závislosti na síle signálu se mohou aktivovat přenašeče či represory signálu a spustit tak odpovídající metabolickou odpověď (Wasteneys, 2004).

Například chladový stres způsobuje depolymeraci MT. Zdá se, že signální řetězec v tomto případě zahrnuje kalmodulin a Ca^{2+} (Nick, 2000; Breviario a Nick, 2000). Zároveň bylo zjištěno, že u tolerantního kultivaru pšenice (*Triticum aestivum* L.) předcházela

obnovení růstu kořene a tvorbě mikrotubulů odolných vůči chladu jejich rychlá, ale tranzientní a současně částečná depolymerace. Byla-li tranzientní depolymerace způsobena uměle antimikrotubulárním herbicidem pronaminem, získaly rostliny taktéž odolnost vůči chladu (Abdrakhamanova *et al.*, 2003).

Tranzientní depolymerace mikrotubulů je zřejmě spojena s vzrůstem cytosolické koncentrace Ca^{2+} , a je tak součástí signálních drah v rostlinné buňce. Kinezinu podobný protein vázající kalmodulin (KCBP, kinesin-like calmodulin binding protein) je příkladem možného prostředníka mezi MT ovlivněnými Ca^{2+} a regulací transkripce (Wasteneys, 2004).

Reorganizace mikrotubulů souvisí též s aktivitou fosfolipázy D (PLD), která je spojuje s plazmatickou membránou. Za působení aktivátorů PLD, např. n-butanolu, NaCl, mastoparanu, xylanázy a hypoosmotického stresu, byly kortikální mikrotubuly uvolněny z vazby s PM a částečně depolymerovaly. Izomery n-butanolu, které neaktivovaly PLD, neměly ani vliv na organizaci kortikálních mikrotubulů (Dhonukshe *et al.*, 2003). Je možné, že aktivace PLD taktéž reguluje aktivitu určitých proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAP), které kontrolují stabilitu a organizaci kortikálních mikrotubulů. V každém případě, PLD může být zprostředkovatelem reorganizace kortikálních mikrotubulů v odpovědi na různé vývojové nebo vnější stimuly (Dixit a Cyr, 2004).

3 Materiály a metody

3.1 Rostlinný materiál

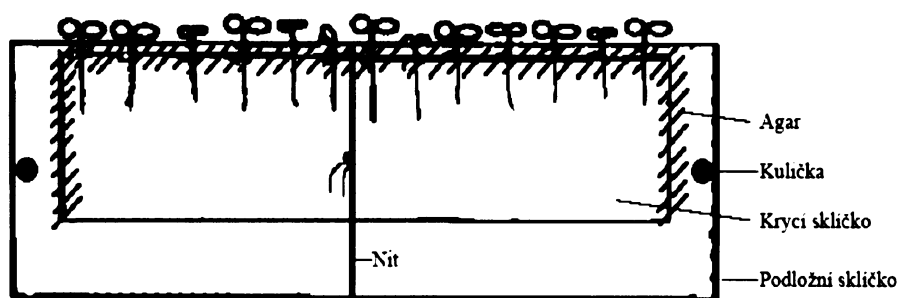
Jako rostlinný materiál jsem použila rostliny *Arabidopsis thaliana*. Pro růstové analýzy a imunofluorescenci byly použity divoké rostliny, pro pozorování *in vivo* posloužila GFP-tubulin exprimující linie *Arabidopsis thaliana* (Ueda *et al.*, 1999), laskavě poskytnuta prof. Hashimotem, a GFP-MAP65-1 exprimující linie *Arabidopsis thaliana* (Chang *et al.*, 2005), laskavě poskytnuta Dr. A. Smertenkem.

3.2 Sterilizace semen

Semena bylo nutné před sázením ošetřit tak, aby bylo zabráněno kontaminacím a aby bylo při kultivaci docíleno stejnoměrného růstu. Nejprve byla rychle omyta 70% etanolem, poté ponechána na 10 minut v roztoku 50% SAVA. Následovalo důkladné promytí sterilní destilovanou vodou (zhruba 5 cyklů), aby byla semena zbavena zbytků SAVA. Semena byla ponechána po dobu 2-3 dnů ve 4°C. Všechny práce byly prováděny ve sterilních podmínkách.

3.3 Kultivace v hydroponii

Semena byla sterilně nasázena na sklíčka speciálně sestavená a upravená k tomuto účelu (viz Obr. 3.1), modifikováno dle Koyama *et al.*, 1995). K sestavení sklíčků byla použita nit a agar (7g/litr vody). Jednotlivá sklíčka byla umístěna do průhledné skleněné



Obr. 3.1

barvicí vaničky, jejich pohybu bylo zabráněno umístěním skleněné kuličky do drážky stojánku. Do vaničky se sklíčky bylo nalito kultivační médium přibližně 3mm pod úroveň semínek. Víčko bylo ještě po přiklopení s vaničkou spojeno parafilmem. Tak bylo zabráněno pronikání spór a nečistot. Celá souprava byla umístěna do kultivační místnosti. Rostliny zde byly pěstovány po dobu 4-11 dnů při teplotě 21°C a světelné periodě 16 hodin.

Tento způsob kultivace je sice pracný, ale má nesporné výhody. U rostlin lze sterilně a přímo na sklíčku měřit různé parametry. Neméně důležité pro posuzování působení látek v médiu je schopnost pronikání těchto látek do kořene ze všech stran, což

při kultivaci na agaru nemůžeme zajistit, látky obsažené v médiu zde působí pouze z jedné strany kořene.

Jako kultivační roztok sloužilo sterilní ½ Murashige a Skoog médium o hodnotě pH 5,8 zhotovené ze směsi základních solí MS (Sigma, M5524) obohacené pyridoxinem (Sigma), kyselinou nikotinovou (Sigma), thiaminem (Sigma), myo-inozitem (Sigma) a 1% sacharózou.

Rozpis na přípravu 1l média:

MS (Sigma)	2,15g
sacharóza	10g
myo-inozitol	50mg
pyridoxin	0,5mg
kyselina nikotinová	0,5mg
thiamin	5mg

3.4 Analýza růstu kořenů

3.4.1 Rostlinný materiál

Arabidopsis thaliana pěstovaná v ½ MS s 1% sacharózou v kultivační místnosti po dobu tří dnů.

3.4.2 Kultivační média

Vysterilizovaná semínka byla nasazena do ½ MS s 1% sacharózou, kde klíčila a semenáčky z nich rostly první tři dny. Poté byla celá skříčka s třídenními rostlinami sterilně přenesena do různých kultivačních médií dle prováděného pokusu a ponechána v nich po stanovenou dobu. V průběhu pokusu byla skla s rostlinami sterilně vyjímána z růstového roztoku, kořeny byly snímány a skla s rostlinami byla vracena zpět do pokusného média.

Složení kultivačních médií pro analýzu růstu kořenů:

Základní růstová analýza kořenů:

- 1) Kontrola: ½ MS s 1% sacharózou, pH 5,8
- 2) 100 µM AlCl₃·6H₂O (Sigma), 100 µM CaCl₂, 1% sacharóza, pH 4,3
- 3) 100 µM AlCl₃·6H₂O (Sigma), 1% sacharóza, pH 4,3
- 4) 100 µM CaCl₂, 1% sacharóza, pH 4,3
- 5) 1% sacharóza, pH 4,3

V tomto případě jsem sledovala jednak krátkodobé efekty médií na růst kořenů (kořeny byly měřeny po 0, 6, 12 a 24 hodinách), jednak dlouhodobé efekty médií (délka kořenů byla zjišťována po 0 a 4 dnech kultivace).

Vliv Al³⁺, glutamátu a taxolu na růst kořenů:

- 1) Kontrola: ½ MS s 1% sacharózou, pH 5,8
- 2) 100 µM AlCl₃·6H₂O (Sigma), 1% sacharóza, pH 4,3
- 3) 5mM glutamát, (monohydrát glutamátu draselného, C₅H₈KNO₄·H₂O) (Fluka), 1% sacharóza, pH 6,0
- 4) 100µM AlCl₃·6H₂O (Sigma), 1µM taxol, 1% sacharóza, pH 4,3
- 5) 1µM taxol, 1% sacharóza, pH 5,5

Zde jsem sledovala dlouhodobý účinek jednotlivých médií na růst kořenů. Délky kořenů byly měřeny po 0 a 4 dnech působení.

Vliv Al³⁺, taxolu a Al³⁺ s předchozím působením taxolu na růst kořenů:

- 1) Kontrola: ½ MS s 1% sacharózou, pH 5,8
- 2) 100 µM AlCl₃·6H₂O (Sigma), 1% sacharóza, pH 4,3
- 3) 1µM taxol (v 1% sacharóze, pH 4,3) působil po dobu 30 minut, teprve následně byly rostlinky přeneseny do roztoku 100µM AlCl₃·6H₂O (Sigma), 1µM taxolu, 1% sacharózy, pH 4,3
- 4) 1µM taxol, 1% sacharóza, pH 4,3

Sledovala jsem délky kořenů po 0, 1 a 2 dnech kultivace.

Vliv Al³⁺, oryzalinu a Al³⁺ s předchozím působením oryzalinu na růst kořenů

- 1) Kontrola: ½ MS s 1% sacharózou, pH 5,8
- 2) 550nM oryzalin, 1% sacharóza, pH 4,3

- 3) 200nM oryzalin 200nM, 1% sacharóza, pH 4,3
- 4) 550nM oryzalin (v 1% sacharóze, pH 4,3) po dobu 30min, následně přeneseno do 550nM oryzalinu s 100 μM $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 1% sacharózou, pH 4,3
- 5) 200nM oryzalin (v 1% sacharóze, pH 4,3) po dobu 30min, následně přeneseno do 200nM oryzalinu s 100 μM $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 1% sacharózou, pH 4,3
- 6) 100 μM $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 1% sacharóza, pH 4,3

Sledovala jsem délky kořenů po 0, 1 a 2 dnech kultivace.

3.4.3 Snímání, měření a hodnocení délek kořenů

Sklička s rostlinkami byla snímána pomocí HITACHI HV-C20 CCD kamery, měření jednotlivých kořínků byla prováděna pomocí programu Lucia. Kořen byl vždy měřen od hypokotylu po špičku. Abych dosáhla jednoznačnosti a vyhnula se špatné interpretaci výsledků, bylo nutné hodnotit vždy větší soubor rostlin. Každý pokus byl nejméně dvakrát opakován, pro přehlednost jsou však uvedeny vždy výsledky jednoho ze dvou pokusů.

Výsledky jsem zpracovala do grafů v programu Sigma Plot 8,0.

Statistické hodnocení dat jsem provedla v programu NCSS97 jednosměrnou analýzou rozptylu (One Way ANOVA). Vzhledem k tomu, že data neměla normální rozdělení, pro rozhodování o signifikantních rozdílech jsem použila Kruskal-Wallisův Z-test mnohonásobného srovnávání. Výsledné hodnocení rozdílů mezi variantami jsem zanesla do tabulek v programu Microsoft Excel.

3.5 Vizualizace mikrotubulů pomocí imunofluorescence

Na imunofluorescenční barvení mikrotubulů jsem používala 3-5denní rostlinky. Mezi jednotlivými kroky byly rostlinky přenášeny v košíčkách se síťovitým propustným dnem. Košíčky byly zhotoveny z laboratorních špiček tak, aby je bylo možné při inkubaci v protilátkách umístit do 2ml mikrocentrifugačních zkumavek. Postup barvení byl převzat ze Sugimota *et al.* (2000) a upraven do následující podoby:

Použité roztoky:

Mikrotubuly stabilizující pufr (MTSB):

50mM PIPES (MP Biomedicals, LLC), 5mM EGTA, 5mM MgSO₄·2H₂O; 0,1% Triton-X100, pH 7,0

fixáž:

4% paraformaldehyd (PFA, Serva) v MTSB

Enzymová lázeň:

0,05% pektolyáza Y-23; 0,4 M manitol v MTSB, přidány inhibitory proteáz 0,3mM PMSF, 10μM Leupeptin a 1,25μM Pepstatin

fosfátový pufr (PBS):

NaCl 8g/l; KCl 0,2 g/l; KH₂PO₄ 0,158 g/l; NaHPO₄·12 H₂O 2,31 g/l

Protilátky:

Primární: monoklonální myší anti-α tubulin, klon DM1α, ředění 1: 1000 (Sigma)

Sekundární: anti-myší Ig-TRITC (Sigma), ředění 1:300

Postup:

1. Fixace ve 4%PFA v MTSB, 2,5 hod., snížený tlak 400-500hPa
2. Rostliny přemístit do košíčků s propustným dnem
3. Promýt v MTSB 3x10 min
4. Inkubovat v enzymové lázni, 20 min
5. Promýt v MTSB 3x10 min
6. Inkubovat v metanolu v -20°C, 15 min
7. Zavodnit v PBS, 10 min
8. Blokovat v 2,0% BSA v PBS, 30 min
9. Inkubovat v primární protilátce v PBS přes noc ve 4°C
10. Promýt v PBS 3x5 min
11. Inkubovat v sekundární protilátce v PBS, 3 hod. ve 37°C
12. Promýt v PBS 5x5 min
13. Zhotovit preparát za použití 50% glycerolu

3.6 Pozorování mikrotubulů a MAP65-1 *in vivo*

Pro pozorování *in vivo* jsem používala čtyřdenní rostlinky GFP-tubulin exprimující linie *A. thaliana*. U GFP-MAP65-1 exprimující linie jsem používala rostlinky starší, nejlépe jedenáctidenní.

Při imunofluorescenčním značení mikrotubulů jsem nejprve jednotlivé rostliny šetrně přenesla hodinářskou pinzetou do malých Petriho misek s příslušnými roztoky. Roztoky AlCl_3 , glutamátu a samotné sacharózy se sníženým pH na 4,3 jsem nechala působit po dobu jedné, patnácti a třiceti minut. Vzhledem k tomu, že gadolinium blokuje některé Ca^{2+} propustné kanály, byly rostliny variant, kde byl testován vliv gadolinia, minimálně 1 hodinu před dalším ošetřením vystaveny působení média s obsahem gadolinia. Následně jsem nechala působit roztoky $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, glutamátu a sacharózou se sníženým pH na 4,3 po dobu 1, 15 a 30 minut. Následovalo samotné imunofluorescenční značení dle postupu popsaného výše.

V případě pozorování GFP-tubulin a GFP-MAP65-1 exprimujících rostlinek jsem roztoky aplikovala přímo na rostlinky umístěné v komůrce na konfokálním mikroskopu. Rostlinka byla nejprve položena do kapky média v otevřené komůrce, kořenové špičky byly zakryty krycím sklíčkem a nasnímány před samotným působením. Následně byly z jedné strany sklíčka promyty za pomoci kapátka nejméně 500 μl příslušného roztoku. Nadbytečný roztok byl odsát z protější strany sklíčka buničinou. Po 5 minutách působení roztoku byly kořenové špičky znovu nasnímány, totéž bylo provedeno po 30 minutách působení. Během 30 minut působení příslušných roztoků byly rostlinky s komůrkou ponechány připevněné na mikroskopickém stolku, aby kořeny byly snímány v téže orientaci. Ve řadě případů bylo možno během působení snímat tytéž části kořenové špičky. Někdy však docházelo během promývání k pohybu kořenové špičky. Následkem bylo, že při dalším snímání byla pozorována kořenová špička poněkud natočená oproti původní pozici. V tomto případě nebylo možno pozorovat tytéž buňky během celého působení, pouze jiné buňky stejné kořenové špičky.

Při sledování působení gadolinia s následným působením příslušných roztoků byly rostliny vystaveny 1 hodině působení gadolinia v Petriho miskách. Teprve před následným působením byly umístěny do komůrky na konfokální mikroskop.

Při imunofluorescenčním značení i pozorování *in vivo* byl testován vliv následujících roztoků:

- 1) Kontrola: ½ MS s 1% sacharózou
- 2) 100 µM AlCl₃·6H₂O (Sigma), 1% sacharóza, pH 4,3
- 3) 1% sacharóza, pH 4,3
- 4) 5mM glutamát (monohydrát glutamátu draselného, C₅H₈KNO₄·H₂O) (Fluka), 1% sacharóza, pH 5,5-6,0
- 5) 100 µM gadolinium (GdCl₃·6H₂O) (Sigma), 1% sacharóza, pH 5,5-6,0

3.7 Mikroskopické pozorování

Imunofluorescenčně značené rostliny jsem snímala na epifluorescenčním mikroskopu (Olympus PROVIS AX 70; Olympus Optical Co., Ltd., Japonsko) při optickém zvětšení 20x nebo 40x. Používala jsem objektivy UPlanApo 20x s numerickou aperturou 0,70 a LUMPlanFl 40x objektiv s vodní imerzí a numerickou aperturou 0,8. Excitováno bylo vlnovou délkou 510-550nm, jako bariérový byl použit 590nm filtr. Používala jsem monochromatickou CCD kameru COHU a program Lucia G/F, verze 4,60 (Laboratory Imaging, Praha). Dále jsem pro pozorování těchto preparátů využila konfokální skenující mikroskop Leica TCS NT (Leica Microsystems Heidelberg GmbH), excitovala jsem vlnovou délkou 543 nm pomocí argon/kryptonového laseru (emise 590nm).

In vivo pozorování GFP-tubulin a GFP-MAP65-1 exprimujících rostlin bylo prováděno výhradně na výše zmíněném konfokálním mikroskopu. GFP byl excitován vlnovou délkou 488nm hélium/neonovým laserem (emise 515-545nm).

Všechny obrázky byly snímány v rovině x,y s měnící se třetí prostorovou souřadnicí z a konvertovány do elektronické podoby s rozlišením 1024x1024 pixelů. Používala jsem objektiv se zvětšením 63x s vodní imerzí a numerickou aperturou 1,2 (HCX PL APO ibd.BL 63,0x1,2 W) a přiblížení (zoom) 1,7 a 4,0.

Kořeny rostlin ovlivněných médii s oryzalinem, taxolem a Al³⁺ v rámci růstové analýzy jsem snímala v procházejícím světle na mikroskopu Olympus PROVIS AX70 při optickém zvětšení 4x pomocí objektivu Olympus UPlan 4x s numerickou aperturou 0,16; video 3 CCD kamery SONY a programu Lucia G, verze 4,60 (Laboratory Imaging, Praha).

3.8 Zpracování obrázků

Obrázky z fluorescenčního mikroskopu PROVIS byly zpracovány v programu Adobe Photoshop 7,0. Série z konfokálního mikroskopu byly složeny v programu Leica Lite (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) a výstupy dále zpracovány v Adobe Photoshop 7,0.

Pro hodnocení četnosti a tloušťky mikrotubulů jsem použila program ImageJ (volně přístupný na <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) a Excel. Hodnoceny byly jednotlivé interfázové buňky kořene s transversálními svazky MT značenými imunofluorescenční metodou, snímané na konfokálním mikroskopu s čtyřnásobným přiblížením (zoom 4x), jejichž jednotlivé řezy byly složeny v programu Leica Lite (Leica Microsystems Heidelberg GmbH). Z každé varianty bylo hodnoceno vždy 10-20 buněk. Kolmo k mikrotubulům byla vedena úsečka o šířce vždy 10 pixelů a délce odpovídající 15 μm . Na základě hustot fluorescence v průběhu této úsečky byly v programu Excel vypočteny počty a relativní tloušťky svazků mikrotubulů. Hustoty fluorescence v průběhu 1 úsečky byly vyneseny oproti pozicím pixelu a počet MT byl určen dle počtu záporných vrcholů v tomto grafu. Pro hodnocení tloušťky svazků byla provedena první derivace průběhu hustot oproti pozici pixelů a odečtena od absolutní hodnoty této derivace. Výsledek tohoto algoritmu dává nenulovou zápornou hodnotu v místě dvou sousedících MT v rámci 1 svazku, zatímco nulovou hodnotu udává v prázdném místě mezi svazky MT a v místě, kde sousedí okraj svazku MT s prázdným prostorem mezi svazky. Vzdálenost mezi nulovými hodnotami určuje tloušťku (sílu) svazku MT. Číselné hodnoty síly svazků mikrotubulů nevyjadřují přesný počet mikrotubulů ve svazku, je nutno považovat je za relativní. Metoda hodnocení podrobněji viz Schwarzerová *et al.*, 2002.

4 Výsledky

4.1 Analýzy růstu kořenů

Vliv Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH na růst kořenů po 6, 12 a 24 hodinách kultivace

Cílem prvních pokusů bylo zjistit, jak působí Al^{3+} ionty na růst kořenů *Arabidopsis*. Vzhledem k tomu, že Al^{3+} ionty se v roztoku vyskytují pouze za nízkého pH (4,3), byly pro kontrolu měřeny i délky kořenů rostlin kultivovaných v médiu se sníženým pH na 4,3.

Na základě

předchozích

poznatků ohledně

zmírnění Al^{3+}

toxicity jinými

kationty, např. Ca^{2+}

(Kinraide a Parker,

1987), byla za

účelem vyloučení

zmírňujícího

působení jiných

iontů jako médium

použito 1%

sacharóza. Zvlášť

byl ověřován účinek

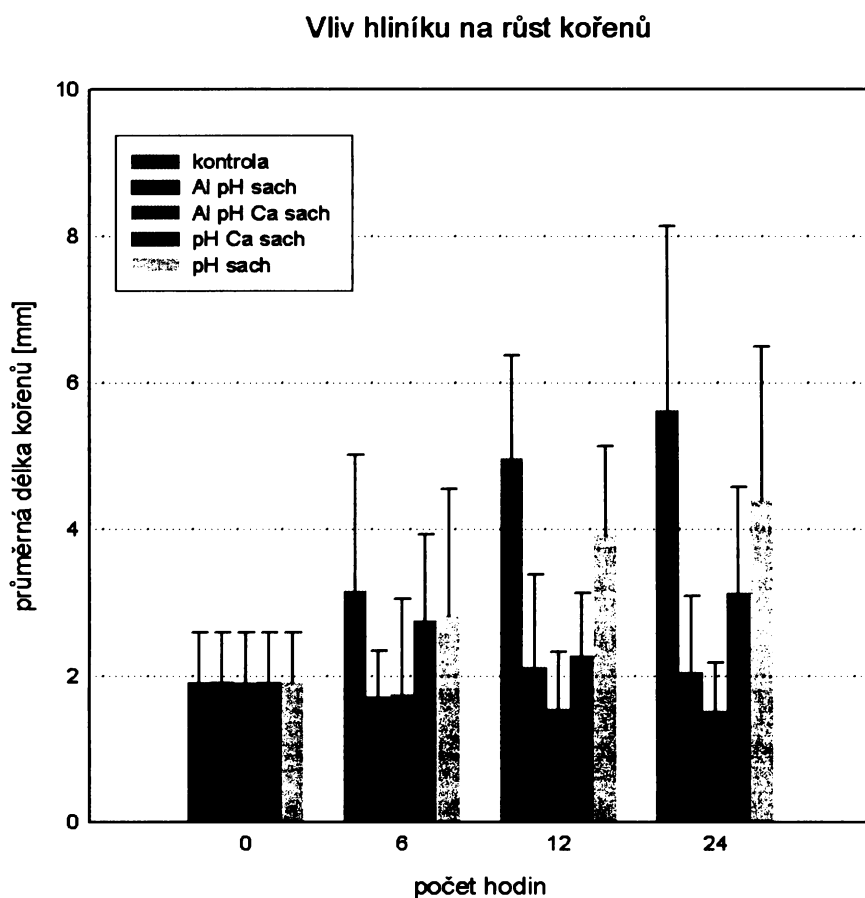
Ca^{2+} . Tři dny po

nasazení a kultivaci

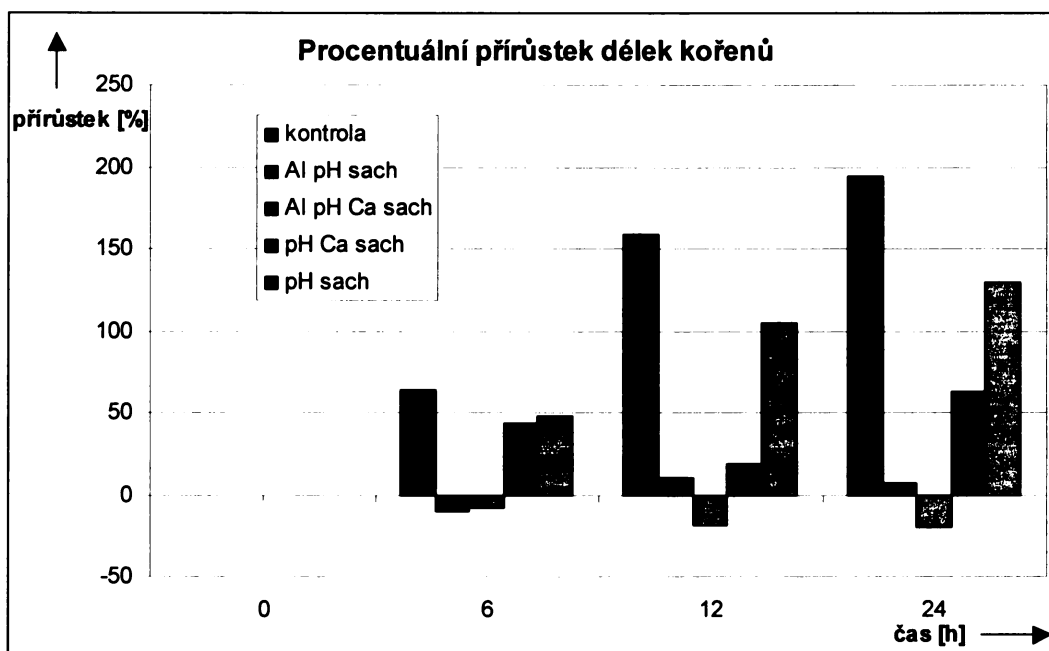
v plném médiu ($\frac{1}{2}$ MS)

byly rostlinky nejprve změřeny (0 hod.) a přeneseny do příslušných médií. Růst kořenů byl sledován po 6, 12, 24 hodinách.

Nejdelší kořeny měly rostlinky v kontrolní variantě, Al^{3+} ionty viditelně zastavují růst. Délky kořenů kultivovaných v médiu s Al^{3+} se nelišily od délek počátečních. Al^{3+} zastavuje růst i v případě dodání Ca^{2+} iontů, tudíž nebyl prokázán zmírňující účinek těchto iontů za toxického působení Al^{3+} . V případě varianty se sníženým pH došlo k očekávanému růstu kořenů, který se významně nelišil od kontrolní varianty. Dodání Ca^{2+} iontů do média se sníženým pH růst kořenů oproti kontrole spíše brzdilo.



Graf 4.1 Vliv Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH na růst kořenů po 6, 12 a 24 hodinách kultivace.



Graf 4.2 Vliv Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH na procentuální přírůstek kořenů po 6, 12 a 24 hodinách kultivace.

	AlpHCasach12h	AlpHCasach24h	AlpHCasach6h	AlpHsach12h	AlpHsach24h	AlpHsach6h	kontrola0h	kontrola12h	kontrola24h	kontrola6h	pHCasach12h	pHCasach24h	pHCasach6h	pHsach12h	pHsach24h	pHsach6h
AlpHCasach12h	-	n	n	n	n	n	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a
AlpHCasach24h	n	-	n	n	n	n	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a
AlpHCasach6h	n	n	-	n	n	n	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a
AlpHsach12h	n	n	n	-	n	n	n	a	a	n	n	a	n	a	a	n
AlpHsach24h	n	n	n	n	-	n	n	a	a	n	n	a	n	a	a	n
AlpHsach6h	n	n	n	n	n	-	n	a	a	a	n	a	a	a	a	n
kontrola0h	n	n	n	n	n	n	-	a	a	a	n	a	n	a	a	n
kontrola12h	a	a	a	a	a	a	a	-	n	a	a	a	a	n	n	a
kontrola24h	a	a	a	a	a	a	a	n	-	a	a	a	a	n	n	a
kontrola6h	a	a	a	n	n	a	a	a	a	-	n	n	n	n	n	n
pHCasach12h	a	a	a	n	n	n	n	a	a	n	-	n	n	a	a	n
pHCasach24h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	-	n	n	n	n
pHCasach6h	a	a	a	n	n	a	n	a	a	n	n	n	-	a	n	n
pHsach12h	a	a	a	a	a	a	a	n	n	n	a	n	a	-	n	a
pHsach24h	a	a	a	a	a	a	a	n	n	n	a	n	n	n	-	a
pHsach6h	a	a	a	n	n	n	n	a	a	n	n	n	n	a	a	-

Tab. 4.1 Statistické hodnocení rozdílů délek kořenů mezi jednotlivými variantami; a=varianty se od sebe signifikantně liší, n=varianty se od sebe signifikantně neliší.

Vliv Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH na růst kořenů po 4 dnech kultivace

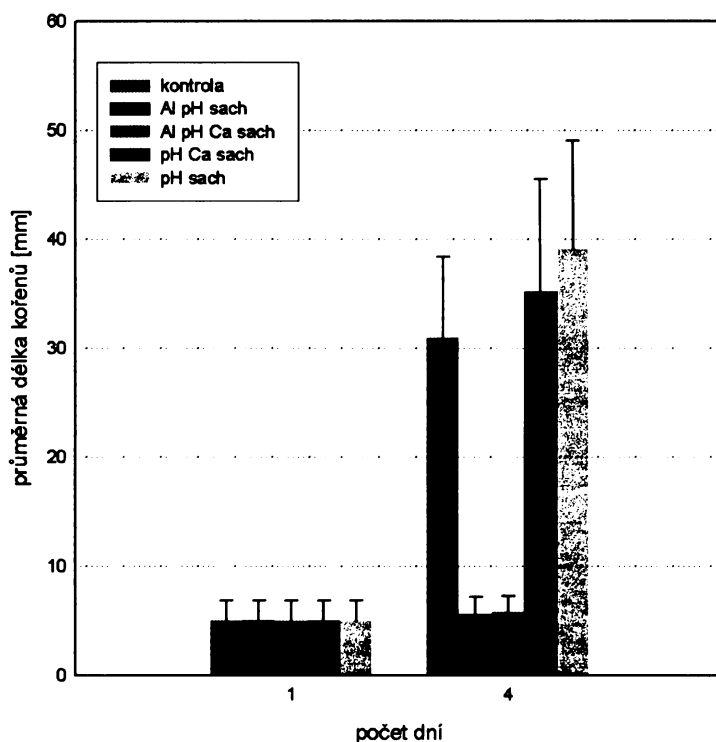
Cílem tohoto pokusu

bylo zjistit dlouhodobý účinek Al^{3+} na růst kořenů *Arabidopsis*. Varianty médií byly shodné s předchozími pokusy. Délky kořenů byly měřeny po 4 dnech kultivace v příslušném médiu.

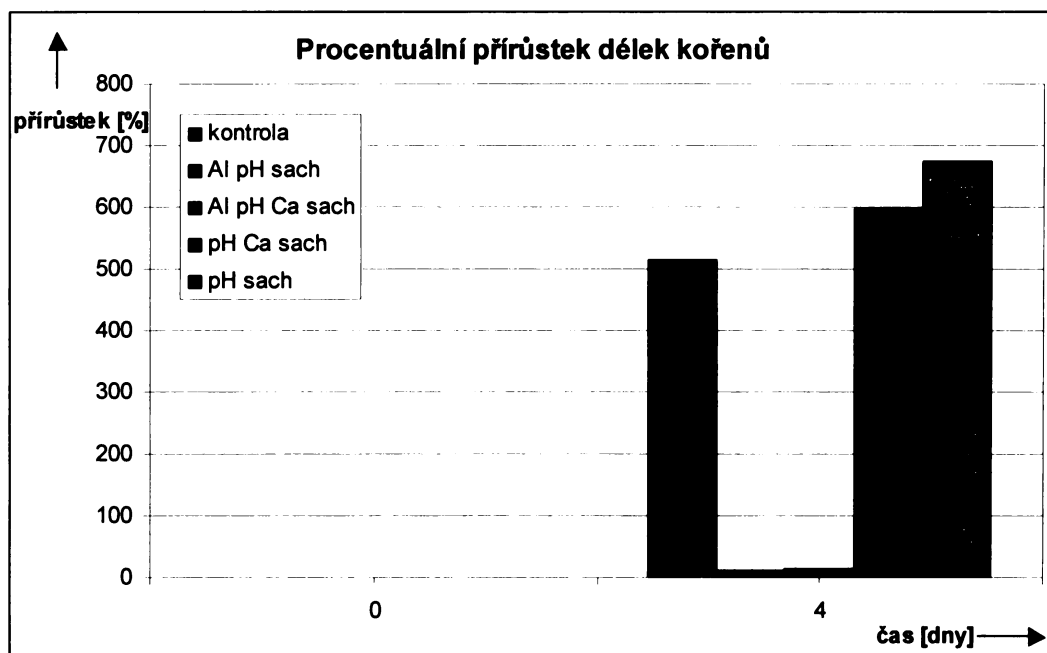
Po 4 dnech kultivace došlo vinou Al^{3+} k výraznému zastavení růstu kořenů. Ca^{2+} nepůsobily opět zmírnění Al^{3+} toxicity. Délky kořenů rostlin kultivovaných v médiu s Ca^{2+}

ionty se sníženým pH a v médiu se samotným sníženým pH se významně nelišily od kontrolní varianty.

Vliv hliníku na růst kořenů



Graf 4.3 Vliv Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH na růst kořenů po 4 dnech kultivace.



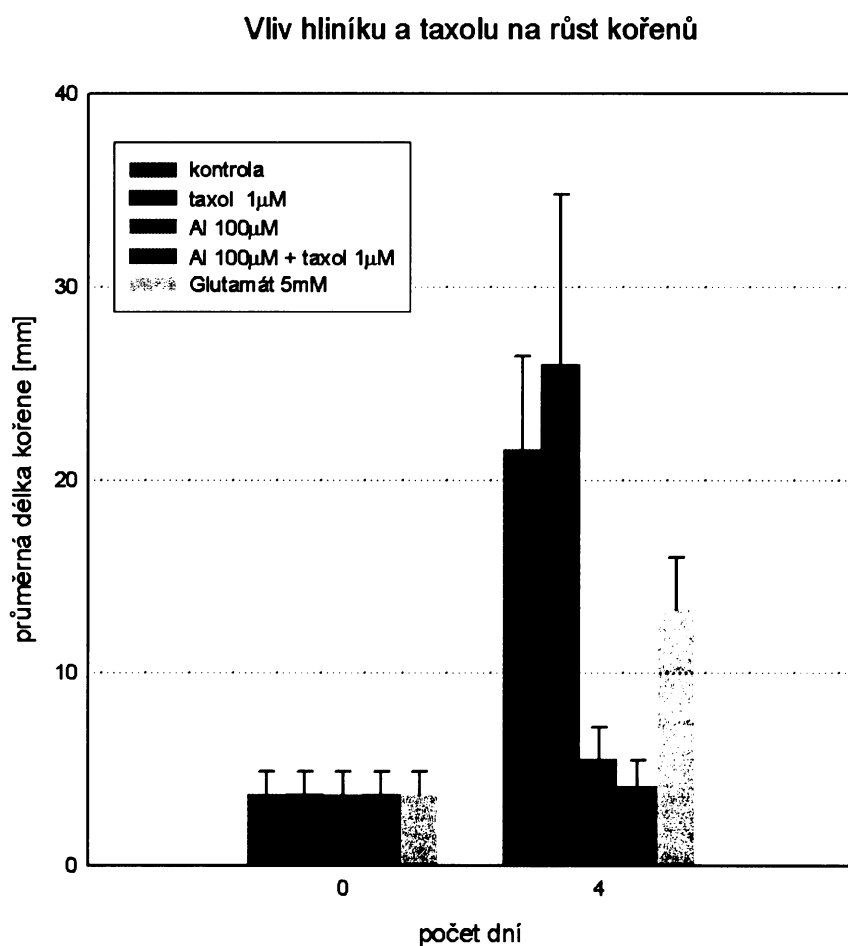
Graf 4.4 Vliv Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH na procentuální přírůstek kořenů po 4 dnech kultivace.

	AlpHsach4d	AlpHCasach4d	pHCasach4d	pHsach4d	K4d	K0d
AlpHsach4d	-	n	a	a	a	n
AlpHCasach4d	n	-	a	a	n	n
pHCasach4d	a	a	-	n	n	a
pHsach4d	a	a	n	-	n	a
K4d	a	a	n	n	-	a
K0d	n	n	a	a	a	-

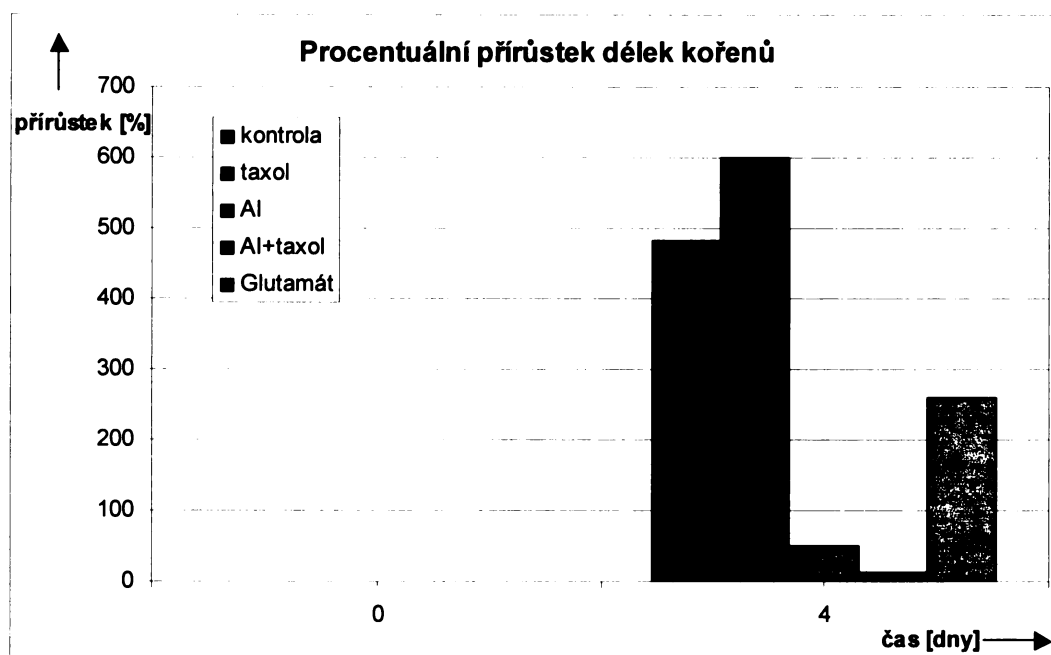
Tab. 4.2 Statistické hodnocení rozdílů délek kořenů mezi jednotlivými variantami; a=varianty se od sebe signifikantně liší, n=varianty se od sebe signifikantně neliší.

Vliv Al^{3+} , glutamátu, taxolu a současného působení Al^{3+} s taxolem na růst kořenů po 4 dnech kultivace

Vzhledem k tomu, že mikrotubuly jsou považovány za jeden z prvních cílů působení Al^{3+} iontů v buňce, zajímal mne vliv cytoskeletálních drog na růst kořenů a srovnání těchto účinků s účinkem samotných Al^{3+} iontů. Bylo sledováno dlouhodobé působení taxolu, drogy, jež stabilizuje mikrotubuly. Po 4 dnech kultivace v médiu s $1\mu\text{M}$ taxolem se délky kořenů signifikantně neliší od délek kořenů kultivovaných po stejnou dobu v kontrolním médiu. Délky kořenů kultivovaných od počátku v médiu s taxolem a hlinitými ionty současně se neliší od počátečních. V tomto případě nebylo na kořeny působeno taxolem předem, byly vystaveny současnému působení taxolu i Al^{3+} již od počátku.



Graf 4.5 Vliv Al^{3+} , glutamátu, taxolu a současného působení Al^{3+} s taxolem na růst kořenů po 4 dnech kultivace.



Graf 4.6 Vliv Al^{3+} , glutamátu, taxolu a současného působení Al^{3+} s taxolem na procentuální přírůstek kořenů po 4 dnech kultivace.

Na makroskopické úrovni mne zajímalo i působení glutamátu. Sivaguru *et al.* (2003b) považují glutamát za účastníka dráhy signalizující přítomnost Al^{3+} , který dokonce způsobuje depolymeraci mikrotubulů rychleji než Al^{3+} . Na makroskopické úrovni z hlediska délek kořenů se ale stejně jako Al^{3+} nechová. Délky kořenů jsou sice po 4 dnech kultivace v médiu s glutamátem oproti kontrolní variantě signifikantně kratší, nicméně se signifikantně liší i od varianty s Al^{3+} .

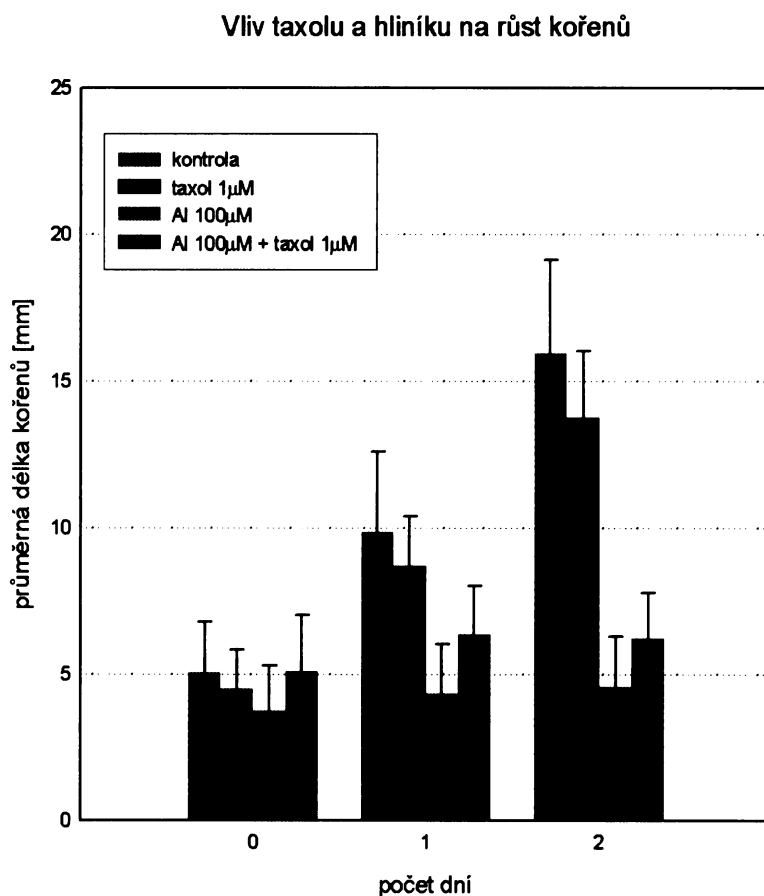
	Al4d	Altaxol4d	Glu4d	K4d	Kt0	taxol4d
Al4d	-	a	a	a	a	a
Altaxol4d	a	-	a	a	n	a
Glu4d	a	a	-	a	a	a
K4d	a	a	a	-	a	n
Kt0	a	n	a	a	-	a
taxol4d	a	a	a	n	a	-

Tab. 4.3 Statistické hodnocení rozdílů délek kořenů mezi jednotlivými variantami; a=varianty se od sebe signifikantně liší, n=varianty se od sebe signifikantně neliší.

Vliv Al^{3+} , taxolu a Al^{3+} s předchozím působením taxolu na růst kořenů po 1 a 2 dnech kultivace

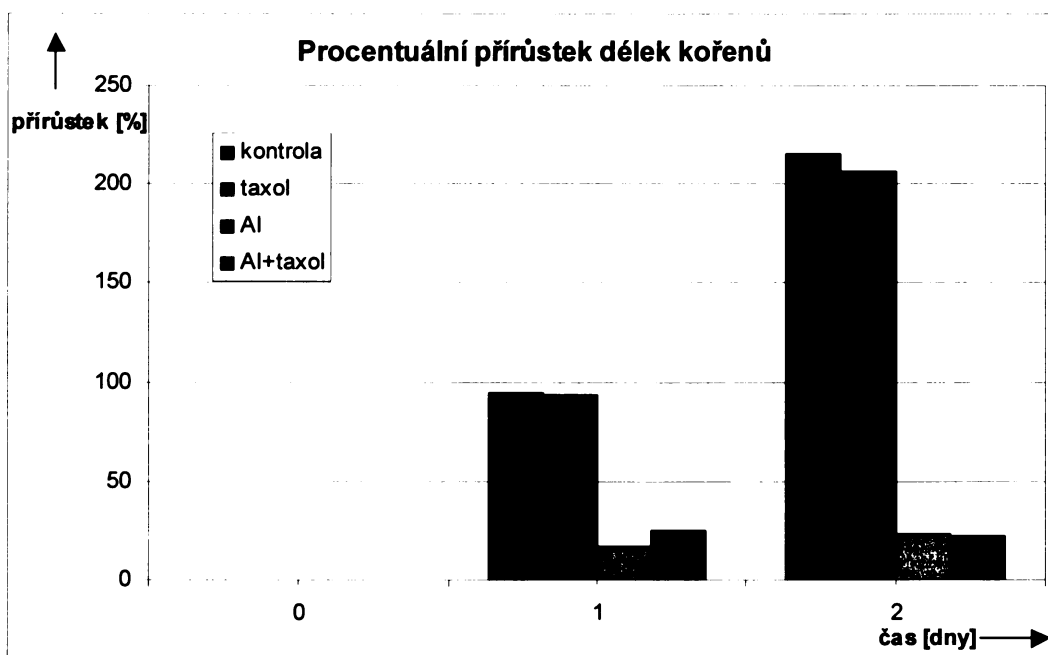
Ověřovala jsem hypotézu, že předchozí stabilizace mikrotubulů taxolem zabrání jejich depolymeraci se signální funkcí vedoucí k zastavení růstu kořene. Proto jsem na kořeny působila taxolem po dobu 30 minut před přesunutím rostlin do média současně obsahujícího Al^{3+} a taxol. Ani toto předchozí působení taxolu se neprojeví jako zmírnění následujícího toxického vlivu Al^{3+} . Délky kořenů se sice statisticky liší, odlišují se však již na počátku před přenesením do příslušných médií, nutno je tedy vzít v potaz přírůstky délek kořenů. Přírůstky délek po 2 dnech kultivace v médiu s taxolem i Al^{3+} se neliší od kořenů kultivovaných v médiu se samotným Al^{3+} . Stírá se tak rozdíl v přírůstcích po 1 dni kultivace, který je možno vysvětlit chybou v měření délek kořenů.

Působení samotného taxolu nemá na délku kořenů po 1 ani 2 dnech průkazný vliv, srovnáme-li tyto délky s kontrolní variantou.



Graf 4.7 Vliv Al^{3+} , taxolu a Al^{3+} s předchozím působením taxolu na růst kořenů po 1 a 2 dnech kultivace.





Graf 4.8 Vliv AI³⁺, taxolu a AI³⁺ s předchozím působením taxolu na procentuální přírůstek kořenů po 1 a 2 dnech kultivace.

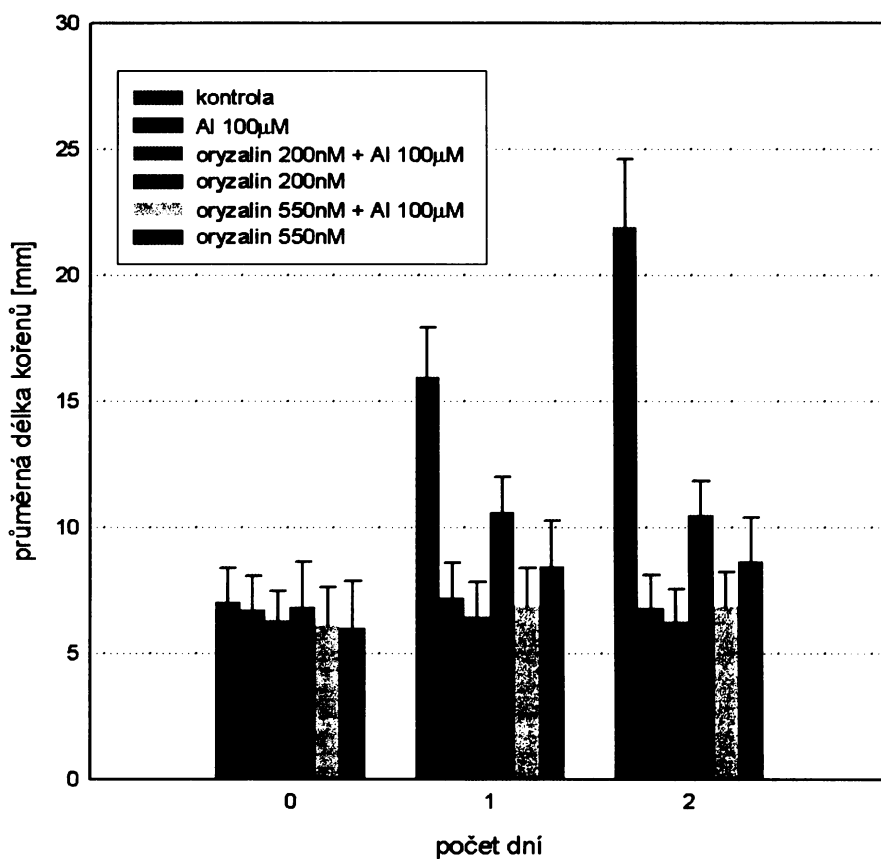
	AI0d	AI1d	AI2d	AI_taxol0d	AI_taxol1d	AI_taxol2d	K0d	K1d	K2d	taxol0d	taxol1d	taxol2d
AI0d	-	n	n	a	a	a	a	a	a	n	a	a
AI1d	n	-	n	n	a	a	n	a	a	n	a	a
AI2d	n	n	-	n	a	a	n	a	a	n	a	a
AI_taxol0d	a	n	n	-	a	a	n	a	a	n	a	a
AI_taxol1d	a	a	a	a	-	n	a	a	a	a	a	a
AI_taxol2d	a	a	a	a	n	-	a	a	a	a	a	a
K0d	a	n	n	n	a	a	-	a	a	n	a	a
K1d	a	a	a	a	a	a	a	-	a	a	n	a
K2d	a	a	a	a	a	a	a	a	-	a	a	n
taxol0d	n	n	n	n	a	a	n	a	a	-	a	a
taxol1d	a	a	a	a	a	a	a	n	a	a	-	a
taxol2d	a	a	a	a	a	a	a	a	n	a	a	-

Tab. 4.4 Statistické hodnocení rozdílů délek kořenů mezi jednotlivými variantami; a=varianty se od sebe signifikantně liší, n=varianty se od sebe signifikantně neliší.

Vliv Al^{3+} , oryzalinu a Al^{3+} s předchozím působením oryzalinu na růst kořenů po 1 a 2 dnech kultivace

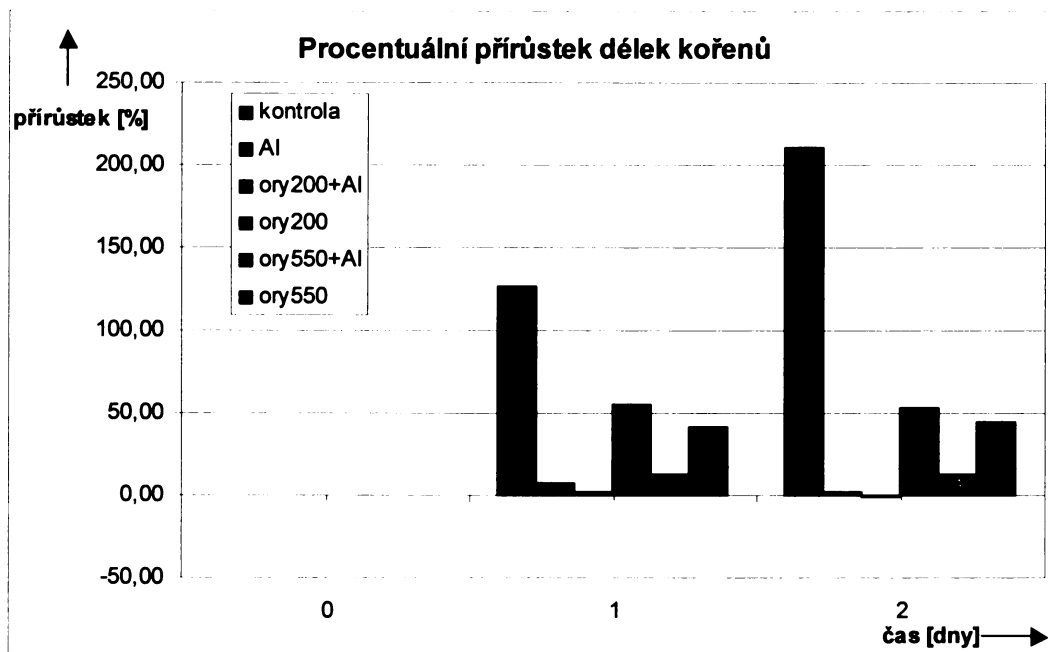
Jako další cytoskeletální drogu jsem použila oryzalin, jenž depolymeruje mikrotubuly, a zjišťovala jeho efekt na růst kořenů po 1 a 2 dnech působení. Dále jsem studovala, zda depolymerace MT oryzalinem 30 minut před samotnou kultivací kořenů v médiu s Al^{3+}

Vliv oryzalinu a hliníku na růst kořenů



Graf 4.9 Vliv Al^{3+} , oryzalinu a Al^{3+} s předchozím působením oryzalinu na růst kořenů po 1 a 2 dnech kultivace.

současně má na růst kořenů vliv. Zatímco kořeny vystavené pouhému oryzalinu první den stále rostou, po delší době působení svůj růst zastavují. Předchozí třicetiminutové působení samotného oryzalinu a následné společné působení oryzalinu s Al^{3+} nemělo vliv na Al^{3+} -indukovanou zástavu růstu kořenů; kořeny v této variantě se neprodlužovaly více než ve variantě pouze s Al^{3+} .



Graf 4.10 Vliv Al^{3+} , oryzalinu a Al^{3+} s předchozím působením oryzalinu na růst kořenů po 1 a 2 dnech kultivace.

	Al0d	Al1d	Al2d	K0d	K1d	K2d	ory200nM0d	ory200nM1d	ory200nM2d	ory200nM_Al0d	ory200nM_Al1d	ory200nM_Al2d	ory550nM0d	ory550nM1d	ory550nM2d	ory550nM_Al0d	ory550nM_Al1d	ory550nM_Al2d
Al0d	-	n	n	n	a	a	n	a	a	n	n	n	n	a	a	n	n	n
Al1d	n	-	n	n	a	a	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n
Al2d	n	n	-	n	a	a	n	a	a	n	n	n	a	a	a	n	n	n
K0d	n	n	n	-	a	a	n	a	a	n	n	a	a	a	a	a	n	n
K1d	a	a	a	a	-	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
K2d	a	a	a	a	n	-	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ory200nM0d	n	n	n	n	a	a	-	a	a	n	n	n	a	a	a	n	n	n
ory200nM1d	a	a	a	a	a	a	a	-	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ory200nM2d	a	a	a	a	a	a	a	n	-	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ory200nM_Al0d	n	a	n	n	a	a	n	a	a	-	n	n	n	a	a	n	n	n
ory200nM_Al1d	n	a	n	n	a	a	n	a	a	n	-	n	n	a	a	n	n	n
ory200nM_Al2d	n	a	n	a	a	a	n	a	a	n	n	-	n	a	a	n	n	n
ory550nM0d	n	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	n	-	a	a	n	a	a
ory550nM1d	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	-	n	a	a	a
ory550nM2d	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	-	a	a	a
ory550nM_Al0d	n	a	n	a	a	a	n	a	a	n	n	n	n	a	a	-	n	n
ory550nM_Al1d	n	n	n	n	a	a	n	a	a	n	n	n	a	a	a	n	-	n
ory550nM_Al2d	n	n	n	n	a	a	n	a	a	n	n	n	a	a	a	n	n	-

Tab. 4.5 Statistické hodnocení rozdílů délek kořenů mezi jednotlivými variantami; a=varianty se od sebe signifikantně liší, n=varianty se od sebe signifikantně neliší.

Mikroskopická pozorování kořenů ovlivněných oryzalinem a taxolem

Obr. 4.1: Kontrolní varianta. Kořen *Arabidopsis* kultivované po dobu 5 dnů v ½ MS s 1% sacharózou, pH 5,8. Na kořeni není patrné žádné natékání ani černání špičky.

Obr. 4.2: Třídenní rostlinky *Arabidopsis* byly po předchozí kultivaci (½ MS v 1% sacharóze, pH 5,8) na následující 2 dny přeneseny do 1% sacharózy s oryzalinem o 200nM koncentraci a pH 4,3 (celková doba kultivace byla 5 dnů). Kořen je na své špičce oproti kontrole znatelně nateklý, jeho barva tmavší. Natékání lze pozorovat i u jednotlivých buněk. Kořenové vlásky se vytváří na samé kořenové špičce, hned za kořenovou čepičkou.

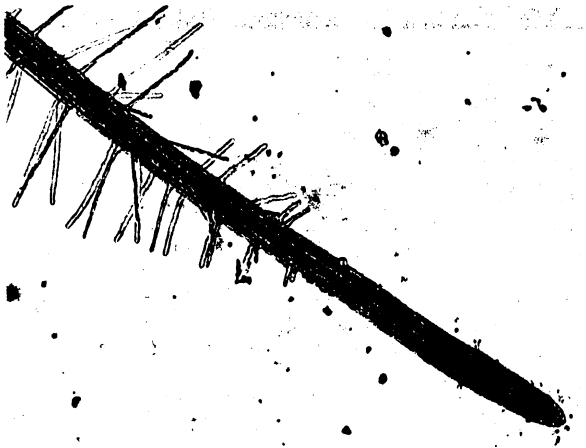
Obr. 4.3: Třídenní rostlinky *Arabidopsis* byly po předchozí kultivaci (½ MS v 1% sacharóze, pH 5,8) na dobu následujících 2 dnů vystaveny působení 550nM oryzalinu v 1% sacharóze, pH 4,3. Oproti 200nM koncentraci oryzalinu je kořenová špička nateklejší. Svou tmavší barvu si kořen uchovává.

Obr. 4.4: Kořeny třídenních rostlin *Arabidopsis* byly vystaveny třicetiminutovému působení 200nM oryzalinu v 1% sacharóze s hodnotou pH 4,3. Následně byly přeneseny a kultivovány po dobu 2 dnů v médiu obsahujícím 200nM oryzalin a 100µM AlCl₃ v 1% sacharóze, pH=4,3. Al³⁺ úplně potlačil efekt oryzalinu, kořeny nenatékají a kořenové vlášení se nejen nevytváří na kořenové špičce, ale začíná se tvořit i dále oproti kontrole. Kořen výrazně mění barvu, tmavne až černá.

Obr. 4.5: Třídenní rostlinky *Arabidopsis* byly vystaveny po 30 minut působení 550nM oryzalinu v 1% sacharóze s hodnotou pH 4,3. Následně byly přeneseny a kultivovány po dobu 2 dnů v médiu obsahujícím 550nM oryzalin a 100µM AlCl₃ v 1% sacharóze, pH=4,3. Oproti nižší koncentraci oryzalinu nedošlo k žádné změně ve vzhledu kořene.

Obr. 4.6: Kořeny třídenních rostlinek *Arabidopsis thaliana* byly kultivovány po dobu 2 dnů v médiu obsahujícím 100µM AlCl₃ v 1% sacharóze, pH=4,3. Kořen zastavuje růst, černá, kořenové vlášení se oproti kontrole vytváří dále od špičky.

Pozn.: Měřítka uvedené na Obr. 4.1 je platné též pro obrázky Obr. 4.2 až Obr. 4.8



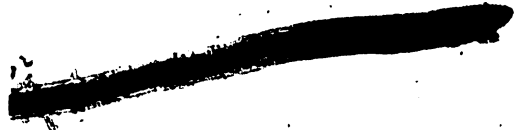
Obr. 4.1 K



Obr. 4.2 Oryzalin 200nM



Obr. 4.3 Oryzalin 550nM



Obr. 4.4 Oryzalin 200nM→oryzalin 200nM+AI



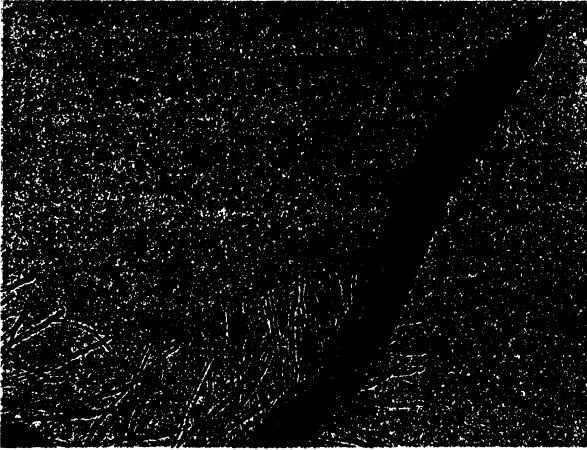
Obr. 4.5 Oryzalin 550nM→oryzalin 550nM+AI



Obr. 4.6 AI

Obr. 4.7: Kořeny třídných rostlinek *Arabidopsis* byly kultivovány po dobu 2 dnů v médiu obsahujícím $1\mu\text{M}$ taxol v 1% sacharóze, $\text{pH} = 4,3$. Je patrné mírné natékání kořenů. Natékání za působení taxolu se ovšem liší od natékání za působení oryzalinu. V případě působení taxolu natéká i elongační zóna kořene. Kořenové vlásky se vytvářejí v obdobné vzdálenosti od špičky kořene jako u kontrolních kořenů, ale vlášení je hustší.

Obr. 4.8: Třídenní kořeny byly na 30 minut vystaveny působení samotného $1\mu\text{M}$ taxolu a poté přeneseny do média s $1\mu\text{M}$ taxolem a $100\mu\text{M}$ AlCl_3 , kde byly následně kultivovány po dobu 2 dnů. Kořeny výrazně černají.



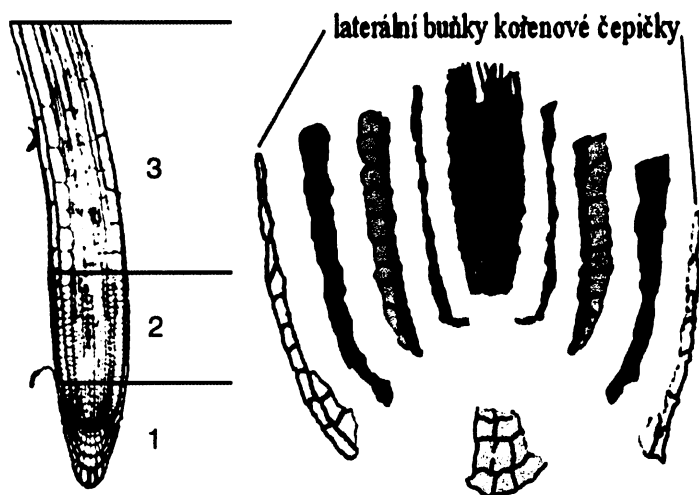
Obr. 4.7 taxol



Obr. 4.8 taxol→taxol+Al

4.2 Imunofluorescenční značení mikrotubulů

V rámci kořene byly pozorovány vždy povrchové buňky (laterální buňky kořenové čepičky) ze stejné oblasti (oblast č.2, viz Obr. 4.9).



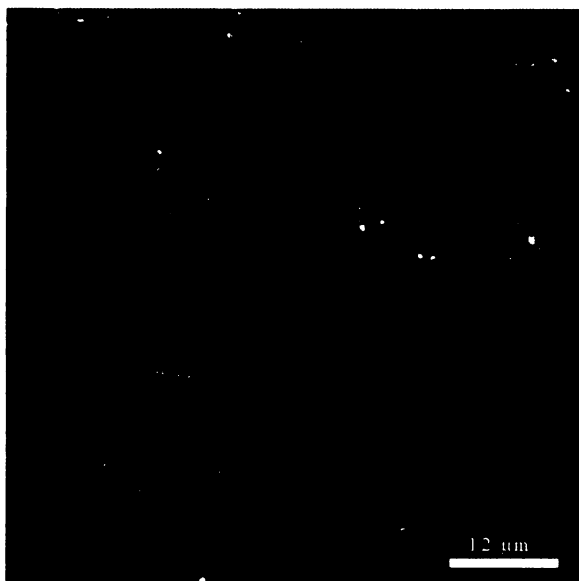
Obr. 4.9 Oblast č. 2 = pozorované buňky.

Obr. 4.10 Imunofluorescenčně značené mikrotubuly po 1 minutě působení $100\mu\text{M}$ AlCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$. V kořenech *Arabidopsis* lze pozorovat okamžité ztenčení mikrotubulárních svazků. Zároveň se zvyšuje jejich počet (viz Graf 4.11) oproti kontrole (viz Obr. 4.13). Po působení Al^{3+} jsou MT jasnější, pravidelně uspořádané do rovnoběžných svazků.

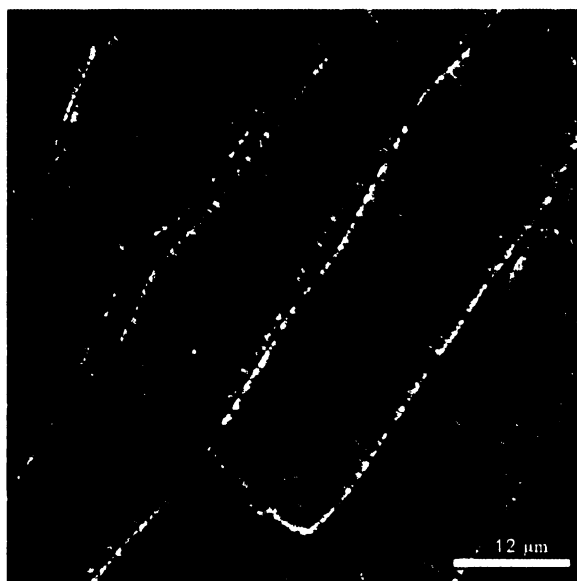
Obr. 4.11: Imunofluorescenčně značené mikrotubuly po 15 minutách působení $100\mu\text{M}$ AlCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$. Svazky mikrotubulů jsou jemnější a zároveň četnější oproti kontrole. Zachovávají si jasnost a pravidelné rovnoběžné uspořádání, které lze pozorovat již po 1 minutě působení Al^{3+} .

Obr. 4.12: Vliv třicetiminutového působení $100\mu\text{M}$ AlCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ na mikrotubuly v kořenech *Arabidopsis* (značeno metodou imunofluorescence). Svazky mikrotubulů jsou jasnější, jemnější a četnější oproti kontrole. Stále si zachovávají pravidelné rovnoběžné uspořádání.

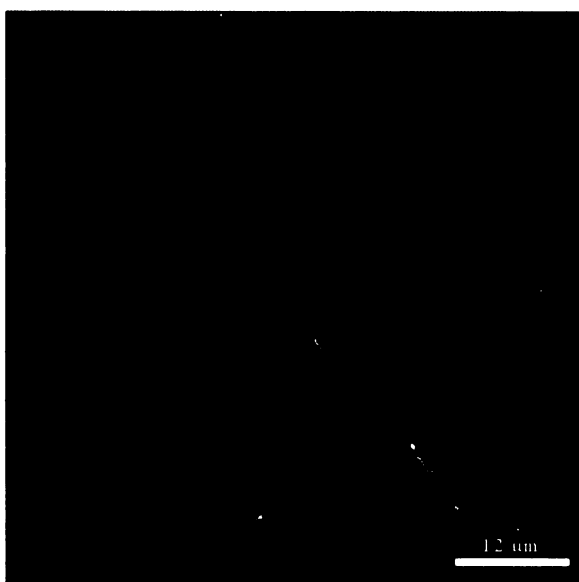
Obr. 4.13: Kontrolní varianta ($\frac{1}{2}$ MS v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,8$). Mikrotubulární svazky jsou silné a jejich uspořádání není vždy rovnoběžné, jak je tomu u mikrotubulárních svazků ovlivněných hlinitými ionty. Svazky mikrotubulů jsou u kontrolní varianty méně četné a zároveň silnější oproti svazkům ovlivněným Al^{3+} , glutamátem a sníženým pH .



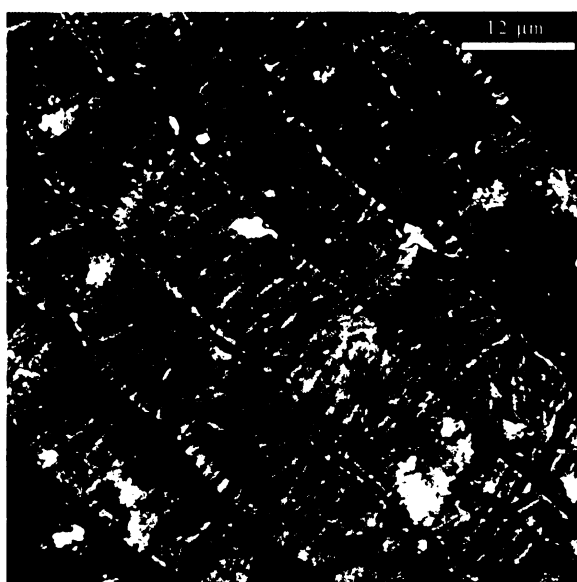
Obr. 4.10 Al 1 min



Obr. 4.12 Al 30 min



Obr. 4.11 Al 15 min



Obr. 4.13 K

Obr. 4.14: Imunofluorescenčně značené mikrotubuly po 1 minutě působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0. MT jsou jemnější a četnější oproti kontrole.

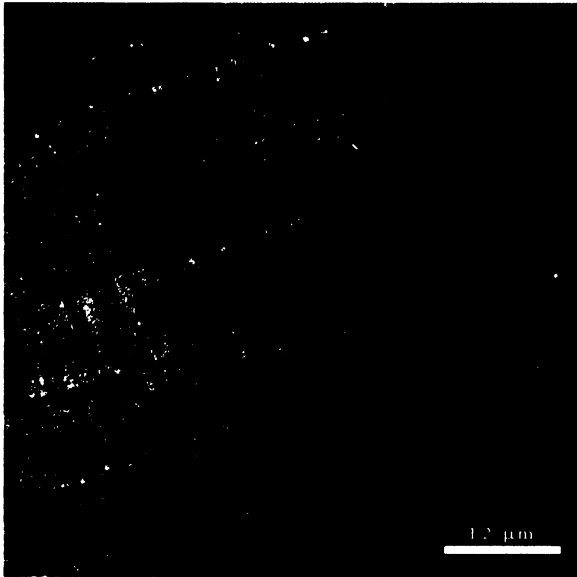
Obr. 4.15: Působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0 po dobu 15 minut. MT jsou tenčí a četnější oproti kontrole. Nastává změna v uspořádání, která se ale ve svém vzhledu liší od změny vyvolané působením Al^{3+} . MT nejsou jasnější ani pravidelně rovnoběžně uspořádané, jak tomu bylo po působení Al^{3+} . Současně se jejich uspořádání liší od MT v kontrolní variantě. Změna v uspořádání nastává vesměs až po 15 minutách působení glutamátu.

Obr. 4.16: Působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0 po dobu 30 minut. Svazky MT jsou dezorientované, nejeví pravidelně rovnoběžné uspořádání jako po působení Al^{3+} . MT jsou tenčí a četnější oproti kontrole.

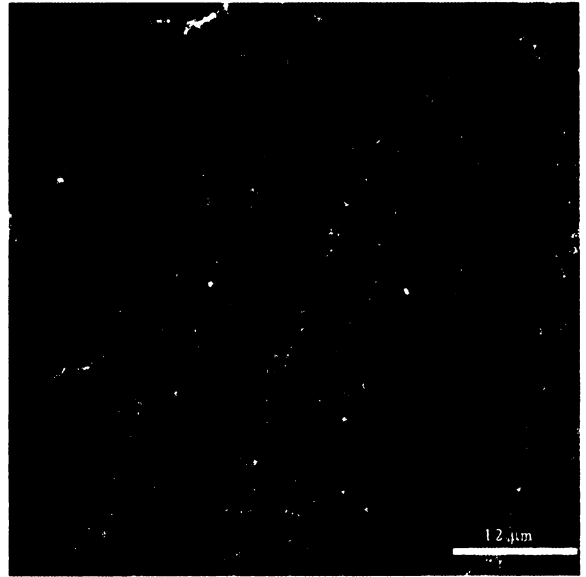
Obr. 4.17: Působení sníženého pH (4,3) v 1% sacharóze po dobu 1 minuty. Taktéž dochází ke ztenčování mikrotubulárních svazků za zvýšení jejich počtu.

Obr. 4.18: Působení sníženého pH (4,3) v 1% sacharóze po dobu 15 minut. Změny způsobené sníženým pH vyústí v dezorganizaci mikrotubulárních svazků. Způsob dezorganizace se liší od dezorganizace vyvolané glutamátem i Al^{3+} . V žádném případě se zde nedá mluvit o rovnoběžném uspořádání, jaké u mikrotubulárních svazků způsobují hlinité ionty.

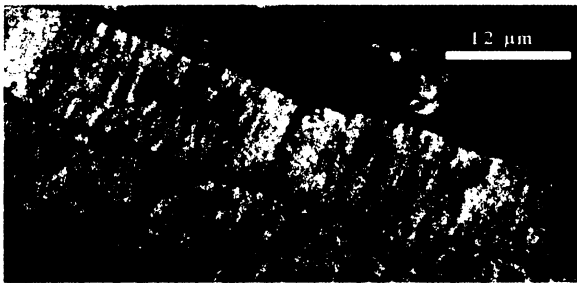
Obr. 4.19: Působení sníženého pH (4,3) v 1% sacharóze po dobu 30 minut. MT jsou tenčí a četnější oproti kontrole. Dezorganizace mikrotubulárních svazků pokračuje, nepodobá se dezorganizaci způsobené glutamátem ani Al^{3+} .



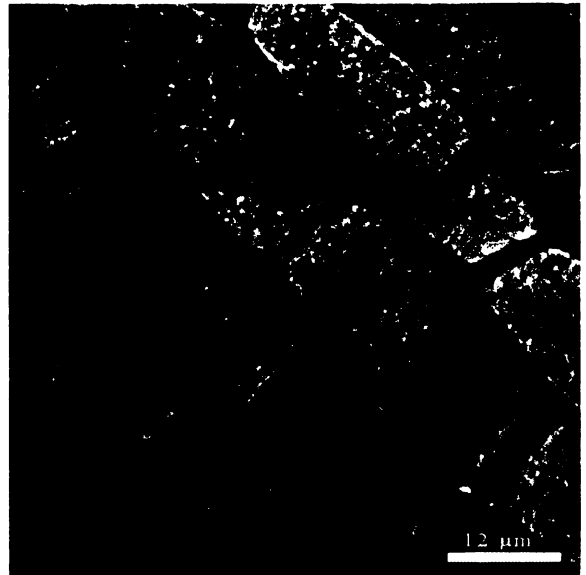
Obr. 4.14 Glutamát 1 min



Obr. 4.17 pH 1 min



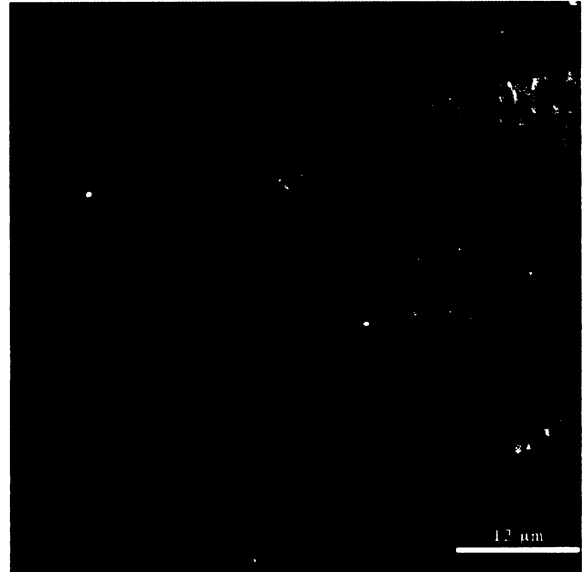
Obr. 4.15 Glutamát 15 min



Obr. 4.18 pH 15 min



Obr. 4.16 Glutamát 30 min



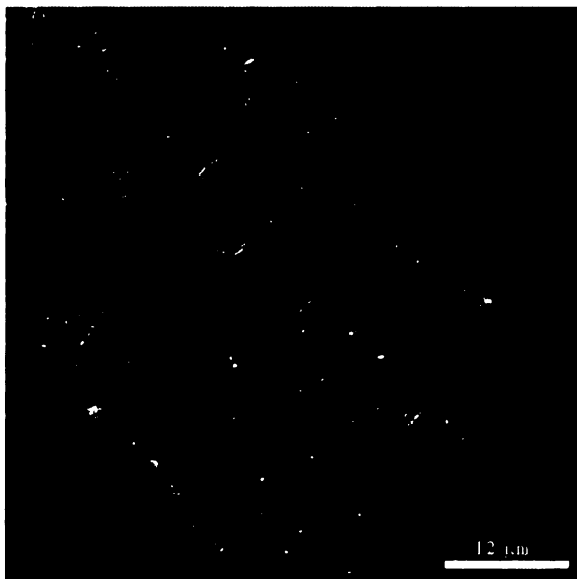
Obr. 4.19 pH 30 min

Obr. 4.20: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení $100\mu\text{M AlCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ po dobu 1 minuty (značeno metodou imunofluorescence). V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky jsou ale jasnější oproti kontrole.

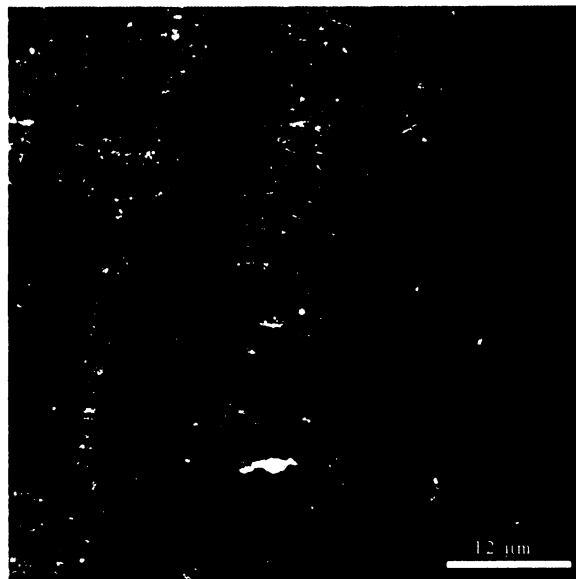
Obr. 4.21: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení $100\mu\text{M AlCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ po dobu 15 minut (značeno metodou imunofluorescence). V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky jsou ale jasnější oproti kontrole.

Obr. 4.22: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení $100\mu\text{M AlCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ po dobu 30 minut (značeno metodou imunofluorescence). V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky jsou ale jasnější oproti kontrole.

Obr. 4.23: Kontrola působení samotného gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1% sacharóza, $\text{pH } 5,5-6,0$). Po 1 hodině působení gadolinia nedochází oproti kontrole ke změnám v počtu a síle mikrotubulárních svazků. Svazky jsou ve většině případů jasnější a kontrastnější oproti kontrole.



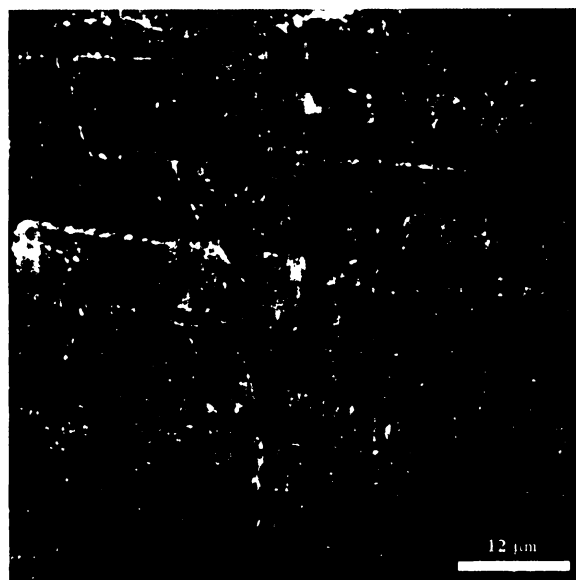
Obr. 4.20 Gd 1 h→Al 1 min



Obr. 4.22 Gd 1 h→Al 30 min



Obr. 4.21 Gd 1 h→Al 15 min



Obr. 4.23 KGd

Obr. 4.24: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$ po dobu 1 minuty. V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky MT jsou ale jasnější oproti kontrole.

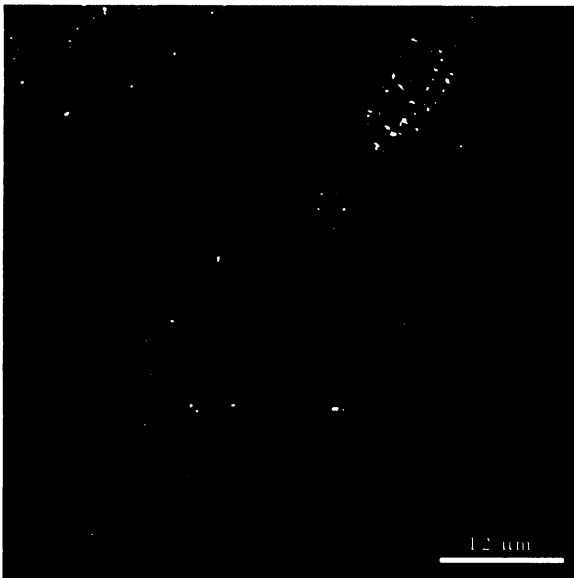
Obr. 4.25: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$ po dobu 15 minut. V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky MT jsou ale jasnější oproti kontrole.

Obr. 4.26: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$ po dobu 30 minut. V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky MT jsou ale jasnější oproti kontrole.

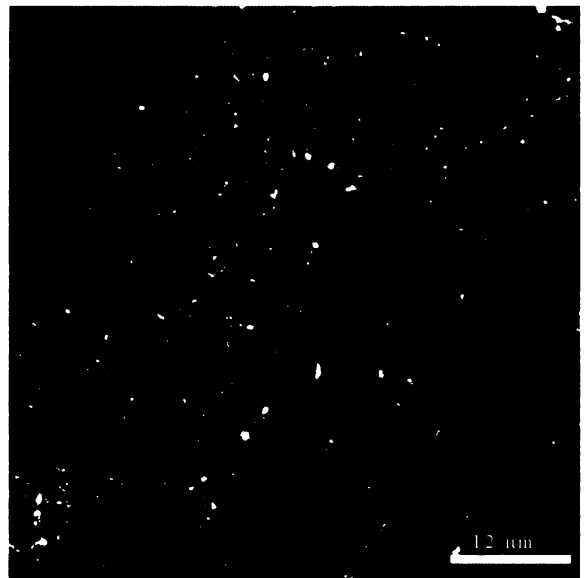
Obr. 4.27: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení sníženého pH v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ po dobu 1 minuty. V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky MT jsou ale jasnější oproti kontrole.

Obr. 4.28: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení následném působení sníženého pH v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ po dobu 15 minut. V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky MT jsou ale jasnější oproti kontrole.

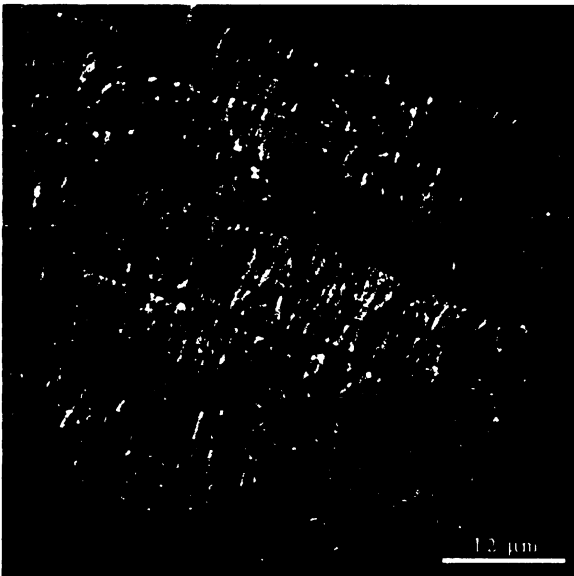
Obr. 4.29: Mikrotubuly po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení sníženého pH v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ po dobu 30 minut. V uspořádání, počtu a síle mikrotubulů nedochází k žádné změně oproti kontrole ani kontrole působení gadolinia. Svazky MT jsou ale jasnější oproti kontrole.



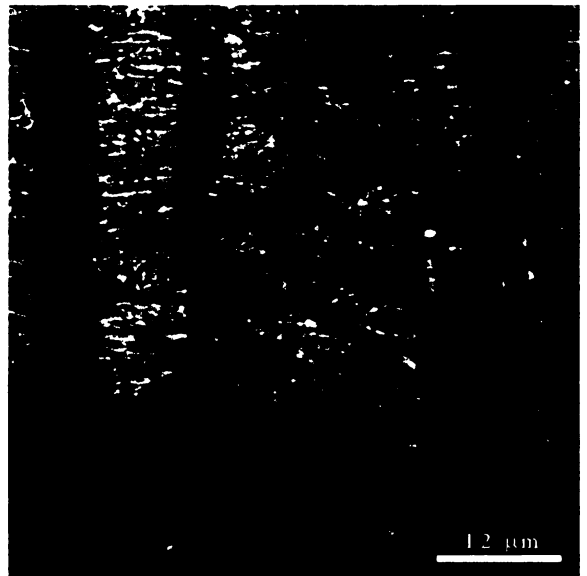
Obr. 4.24 Gd 1 h→glutamát 1 min



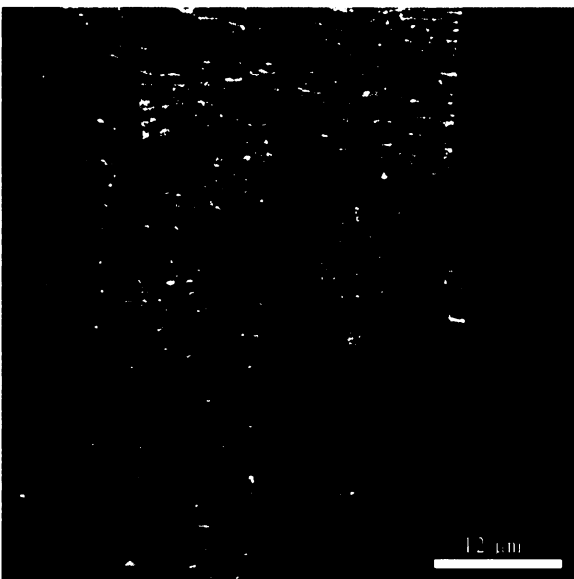
Obr. 4.27 Gd 1 h→pH 1 min



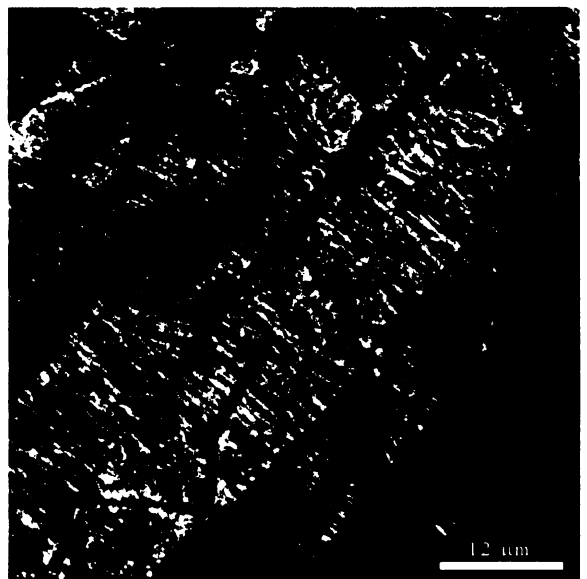
Obr. 4.25 Gd 1 h→glutamát 15 min



Obr. 4.28 Gd 1 h→pH 15 min



Obr. 4.26 Gd 1 h→glutamát 30 min



Obr. 4.29 Gd 1 h→pH 30 min

4.3 Pozorování MAP65-1 *in vivo*

Vliv 0, 5, 30 minut působení Al^{3+} na MAP65-1

Za kontrolních podmínek kolokalizuje MAP65-1 s MT, jeho uspořádání v buňce napodobuje uspořádání MT (viz Obr. 4.30, 4.33, 4.36)¹.

100 μ M $AlCl_3$ (v roztoku 1% sacharózy, pH=4,3) během 5 minut působení vyvolává změny v uspořádání GFP-MAP65-1.

Úsek, ve kterém MAP65-1 kolokalizuje s MT, se zkracuje od konců a stává se přerušovaným (viz Obr 4.31; Schéma 4.1). Po 30 minutách působení Al^{3+} přerušování mizí, úseky MAP65-1 jsou zaceleny a prodlužují se (viz šipky).

Zajímavý doprovodný jev je ztenčování těchto pruhů (viz Obr. 4.32).

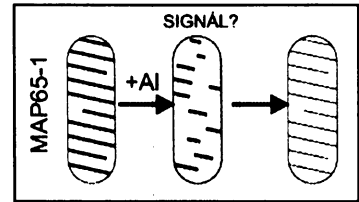


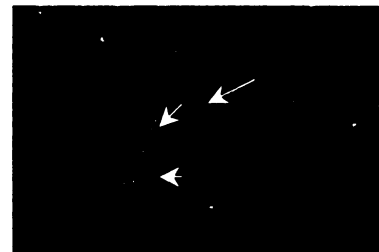
Schéma 4.1



Obr. 4.30 Al 0 min=K



Obr. 4.31 Al 5 min



Obr. 4.32 Al 30 min

Vliv 0, 5, 30 minut působení glutamátu na MAP65-1

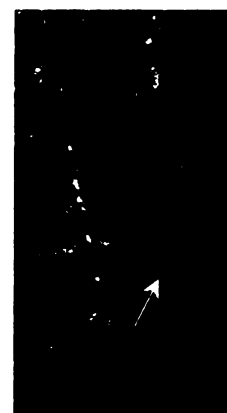
U rostlin promývaných 5mM glutamátem (v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) celkově ubývá úseků MAP kolokalizujících s MT po 30 minutách (viz Obr. 4.35) oproti 0 minutám (K, viz Obr. 4.33), ale úseky se neztenčují. Změna je postupná, čímž se liší od působení Al^{3+} . Nedochozí k tranzientní změně.



Obr. 4.33 Glu 0 min=K



Obr. 4.34 Glu 5 min



Obr. 4.35 Glu 30 min

¹ Pokud není uvedeno jinak, jsou měřítka obrázků v kapitole 4.3 stejná jako na Obr. 4.30.

Vliv působení 0, 5, 30 minut sníženého pH na MAP65-1

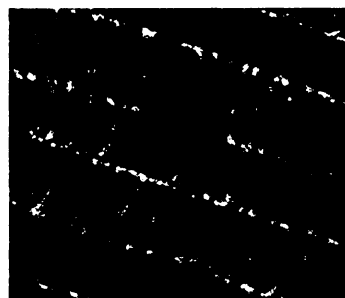
Za působení sníženého pH (1% sacharóza, pH=4,3) ubývá po 30 minutách úseků kolokalizujících s MT (viz Obr. 4.38). U některých rostlin byla zaznamenána i změna v uspořádání a ztenčování.



Obr. 4.36 pH 0 min=K



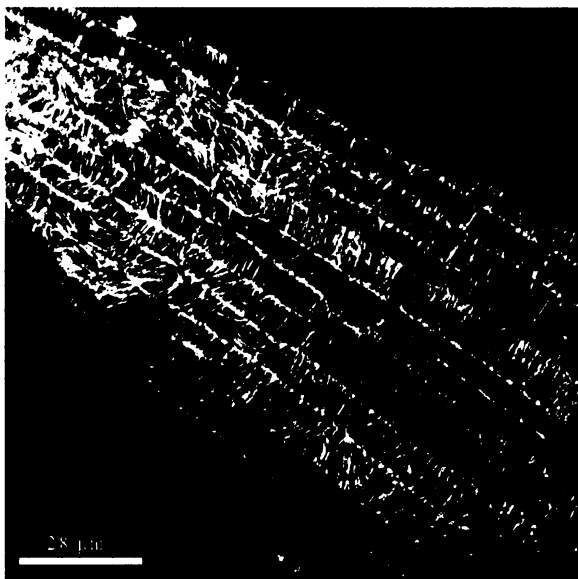
Obr. 4.37 pH 5 min



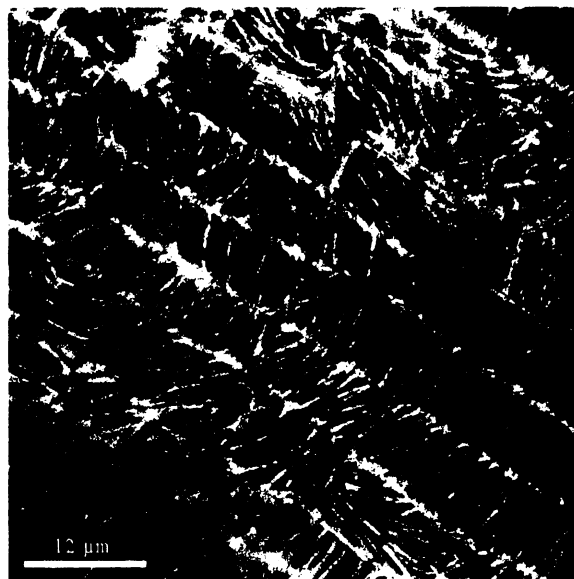
Obr. 4.38 pH 30 min

Vliv 1 hodiny působení gadolinia na MAP65-1 (kontrola působení gadolinia)

Po 1 hodině působení gadolinia (100 μ M $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, 1% sacharóza, pH 5,5-6,0) vydává GFP-MAP65-1 zřetelný signál. Jeho úseky kolokalizující s mikrotubuly jsou jasnější (viz Obr. 4.39, Obr. 4.40).



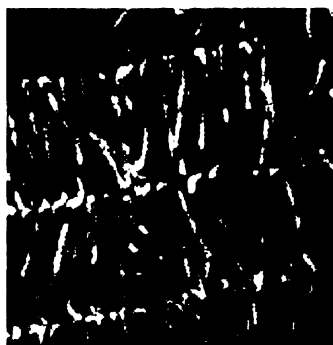
Obr. 4.39 KGd 1 h



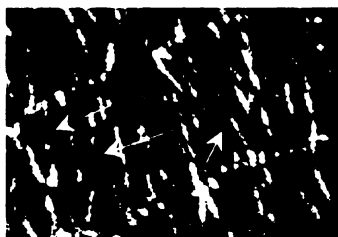
Obr. 4.40 KGd 1 h

Vliv 1 hodiny působení gadolinia a následného působení Al^{3+} po dobu 0, 5, 30 minut na MAP65-1

Po 1 hodině působení gadolinia ($100 \mu\text{M GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1% sacharóza, pH 5,5-6,0) a následném působení $100 \mu\text{M AlCl}_3$ (v 1% sacharóze, pH=4,3) není tranzientní reorganizace MAP65-1 ve smyslu zkracování a přerušování úseků MAP65-1 kolokalizujících s MT tak nápadná a nedochází k ní v takovém rozsahu jako po působení samotného Al^{3+} , ale lze ji nalézt téměř v každé rostlině (viz šipky, Obr. 4.42 a Obr. 4.43).



Obr. 4.41 Gd→Al 0 min



Obr. 4.42 Gd→Al 5 min



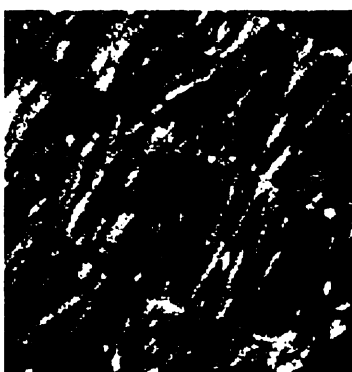
Obr. 4.43 Gd→Al 30 min

Vliv 1 hodiny působení gadolinia a následného působení glutamátu po dobu 0, 5, 30 minut na MAP65-1

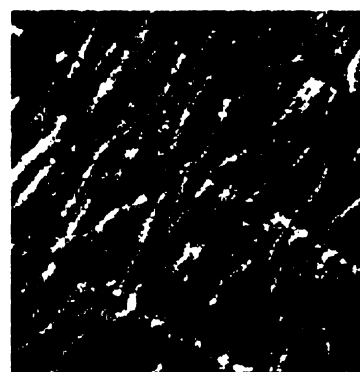
Gadolinium ($100 \mu\text{M GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1% sacharóza, pH 5,5-6,0, 1 hodina) a následné působení 5mM glutamátu (v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) nevyvolává v žádném čase změny v uspořádání MAP65-1 (viz Obr. 4.44, Obr. 4.45, Obr. 4.46).



Obr. 4.44 Gd→Glu 0 min



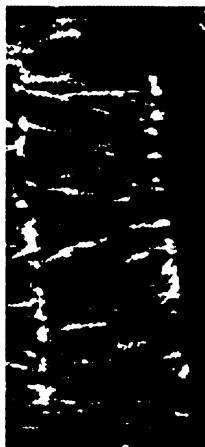
Obr. 4.45 Gd→Glu 5 min



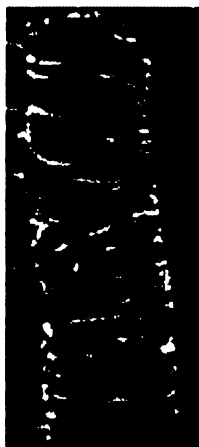
Obr. 4.46 Gd→Glu 30 min

Vliv 1 hodiny působení gadolinia a následného působení sníženého pH po dobu 0, 5, 30 minut na MAP65-1

Gadolinium (100 μM $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1% sacharóza, pH 5,5-6,0, 1 hodina) a následné působení sníženého pH (1% sacharóza, pH=4,3) nevyvolává v žádném čase změny v uspořádání MAP65-1 (viz Obr. 4.47, Obr. 4.48, Obr. 4.49).



Obr. 4.47 Gd→pH 0 min



Obr. 4.48 Gd→pH 5 min



Obr. 4.49 Gd→pH 30 min

4.4 Pozorování mikrotubulů in vivo

Obr. 4.50: Buňky kořene GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* bez působení Al^{3+} .

Obr. 4.51: Působení $100\mu\text{M AlCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ na MT u GFP-tubulin exprimující linie *Arabidopsis* po dobu 5 minut. Signál GFP mizí, jednotlivé mikrotubuly se stávají těžko rozlišitelnými. Můžeme se pouze domnívat, že se ztenčují a zvyšuje se jejich počet.

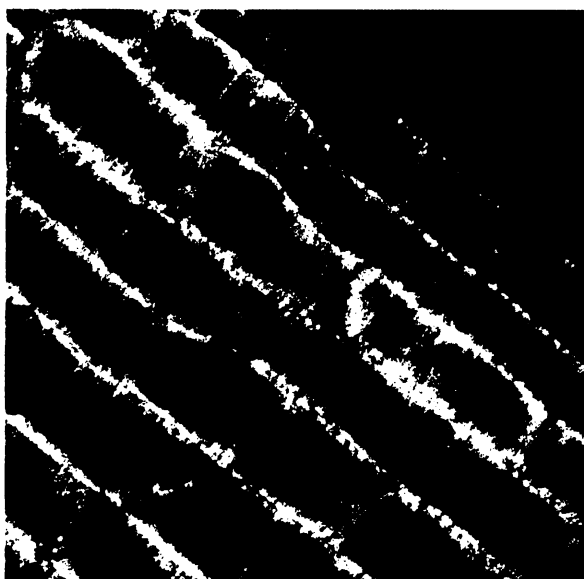
Obr. 4.52: Působení $100\mu\text{M AlCl}_3$ v 1% sacharóze, $\text{pH}=4,3$ po dobu 30 minut. Po 3. pozorování se mikrotubuly stávají ještě hůř rozlišitelnými než u 2. pozorování po 5 minutách působení Al^{3+} . GFP signál MT se téměř vytrácí. V tomto případě již s jistotou můžeme tvrdit, že pozorovaný efekt Al^{3+} na MT se liší u GFP exprimujících linií *Arabidopsis* a u MT značených pomocí imunofluorescence.

Obr. 4.53: Působení glutamátu na buňky kořene GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* v čase 0 minut.

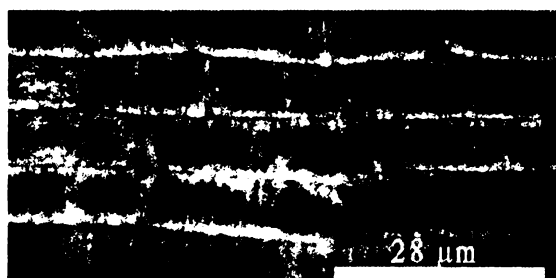
Obr. 4.54: Působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$ po dobu 5 minut. Signál se oproti kontrole v čase 0 minut ztrácí, řady mikrotubulů značených GFP oproti očekávání na základě pozorování imunofluorescenčně značených MT spíše řádnou.

Obr. 4.55: Po 30 minutách působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$ dochází k další ztrátě signálu GFP-tubulinu.

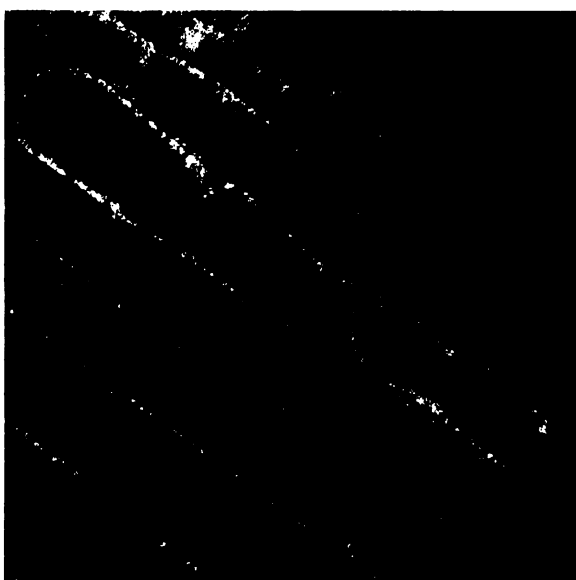
Poznámka: Uvedené měřítko je vždy platné pro celý sloupec obrázků.



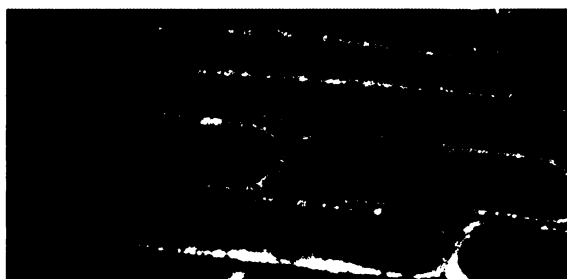
Obr. 4.50 Al 0 min



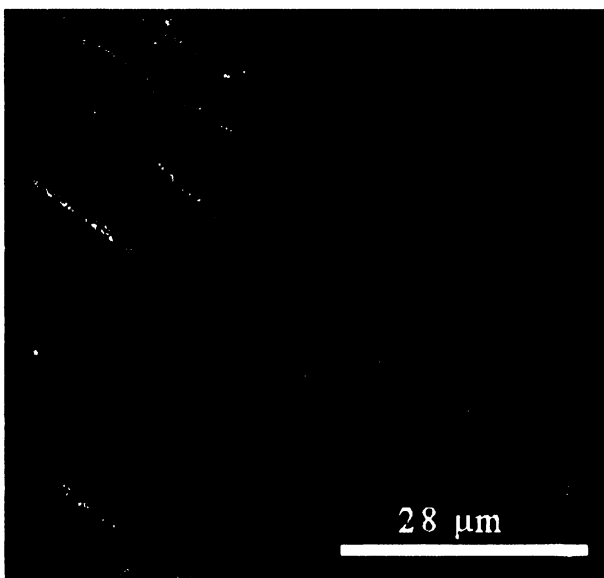
Obr. 4.53 Glutamát 0 min



Obr. 4.51 Al 5 min



Obr. 4.54 Glutamát 5 min



Obr. 4.52 Al 30 min



Obr. 4.55 Glutamát 30 min

Obr. 4.56: Vliv sníženého pH po 0 minutách působení.

Obr. 4.57: Po 5 minutách působení sníženého pH (4,3) v 1% sacharóze se opět ztrácí signál z pozorovaných buněk, mikrotubuly je těžké rozlišovat.

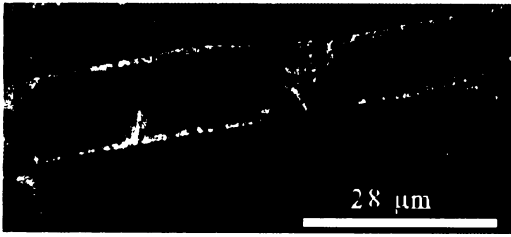
Obr. 4.58: Po 30 minutách působení sníženého pH (4,3) v 1% sacharóze se počet viditelných mikrotubulů snižuje, stávají se řidšími.

Obr. 4.59: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0). Mikrotubuly se neliší od jiných kontrolních (působení v čase 0 minut), jsou zřetelně odlišeny, rozptýlený signál je téměř nulový.

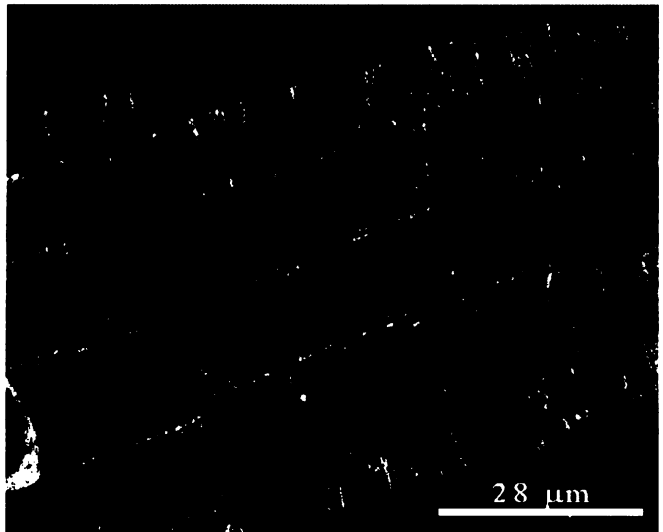
Obr. 4.60: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) a následném působení 100 μM AlCl_3 v 1% sacharóze, pH=4,3 po dobu 5 minut. Nastává pozvolná ztráta signálu, MT jsou hůře rozlišitelné.

Obr. 4.61: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) a následném působení 100 μM AlCl_3 v 1% sacharóze, pH=4,3 po dobu 30 minut. Přestože mikrotubuly značené imunofluorescenční metodou nejeví žádné změny v uspořádání, zde změny nastávají, mikrotubuly mizí, signál se rozptyluje.

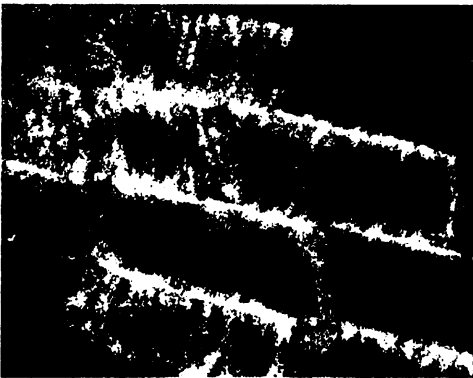
Poznámka: Uvedené měřítko je vždy platné pro celý sloupec obrázků.



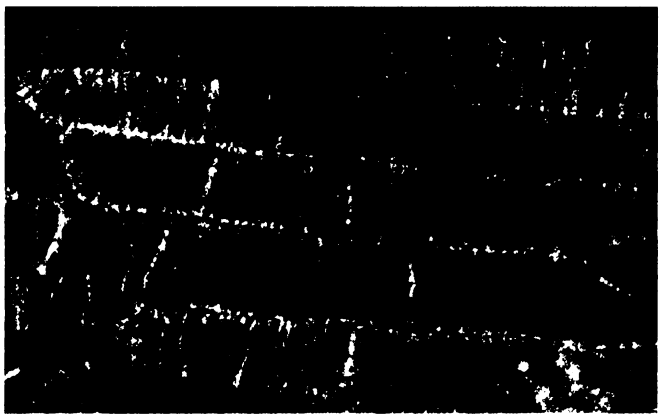
Obr. 4.56 pH 0 min



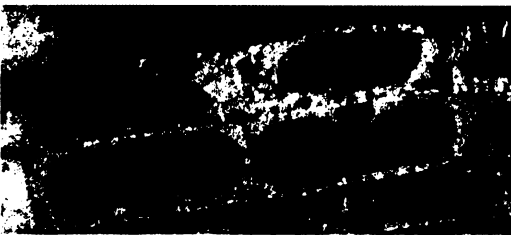
Obr. 4.59 Gd 1 h→Al 0 min



Obr. 4.57 pH 5 min



Obr. 4.60 Gd 1 h→Al 5 min



Obr. 4.58 pH 30 min



Obr. 4.61 Gd 1 h→Al 30 min

Obr. 4.62: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$).

Obr. 4.63: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$ po dobu 5 minut.

Obr. 4.64: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$ po dobu 30 minut. Opět dochází oproti 0 i 5 minutám působení ke ztrátě signálu, MT řídnu, v některých buňkách dokonce úplně mizí.

Obr. 4.65: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$).

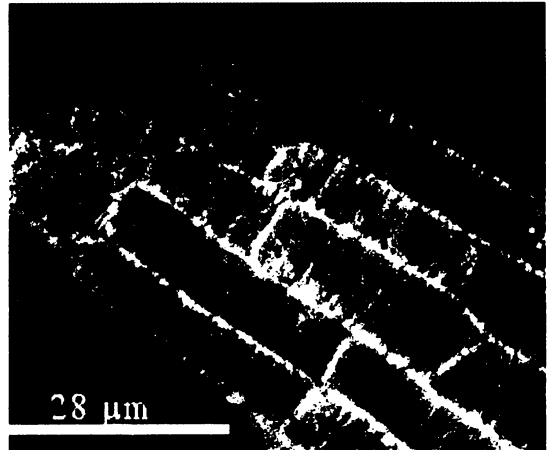
Obr. 4.66: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení sníženého pH (4,3) v 1% sacharóze po dobu 5 minut. Signál se postupně ztrácí, mikrotubuly se nejeví tak četně jako je tomu u kontroly.

Obr. 4.67: Mikrotubuly u GFP-tubulin exprimující *Arabidopsis* po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) a následném působení sníženého pH (4,3) v 1% sacharóze po dobu 30 minut. V některých buňkách signál MT mizí, v jiných pouze slábne.

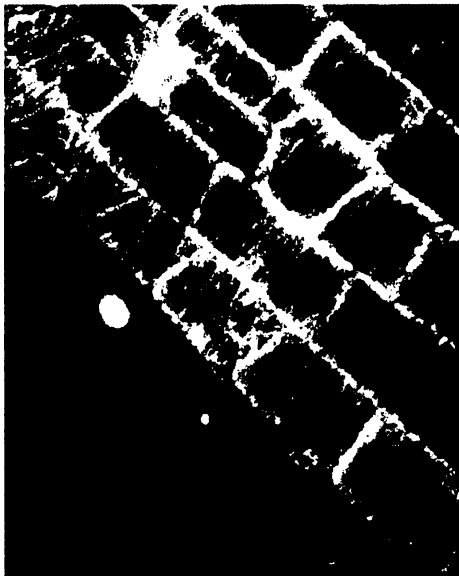
Poznámka: Uvedené měřítko je vždy platné pro celý sloupec obrázků.



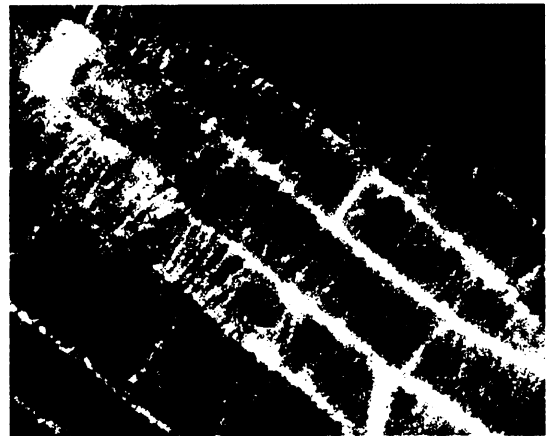
Obr. 4.62 Gd 1 h→glutamát 0 min



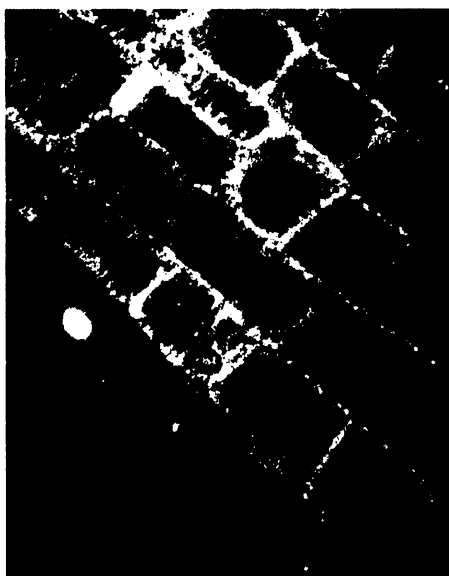
Obr. 4.65 Gd 1 h→pH 0 min



Obr. 4.63 Gd 1 h→glutamát 5 min



Obr. 4.66 Gd 1 h→pH 5 min

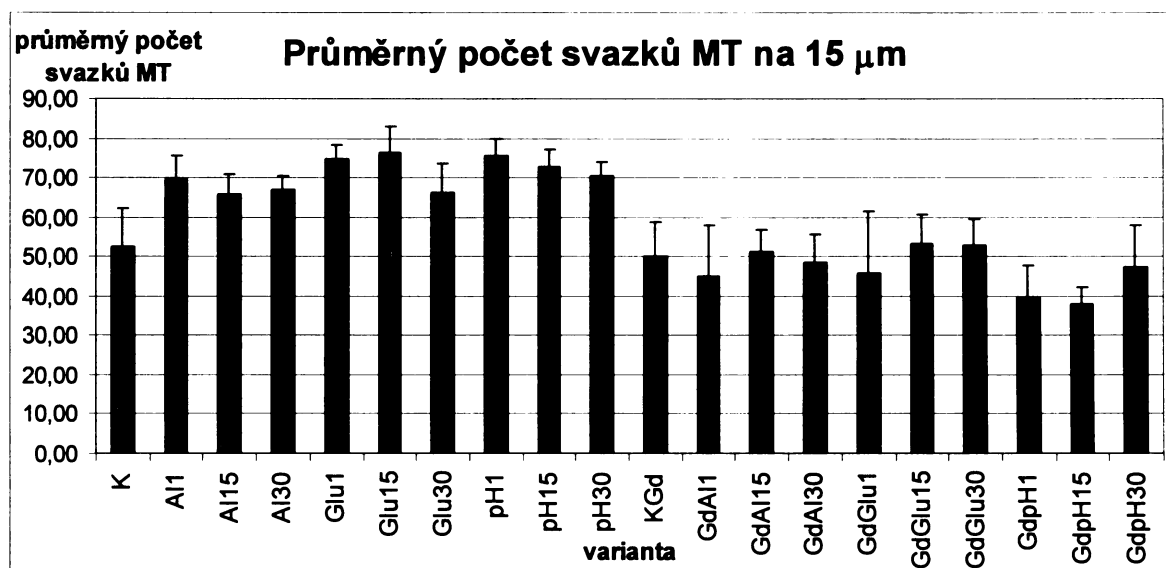


Obr. 4.64 Gd 1 h→glutamát 30 min



Obr. 4.67 Gd 1 h→pH 30 min

4.5 Hodnocení počtů a relativních tloušťek mikrotubulů



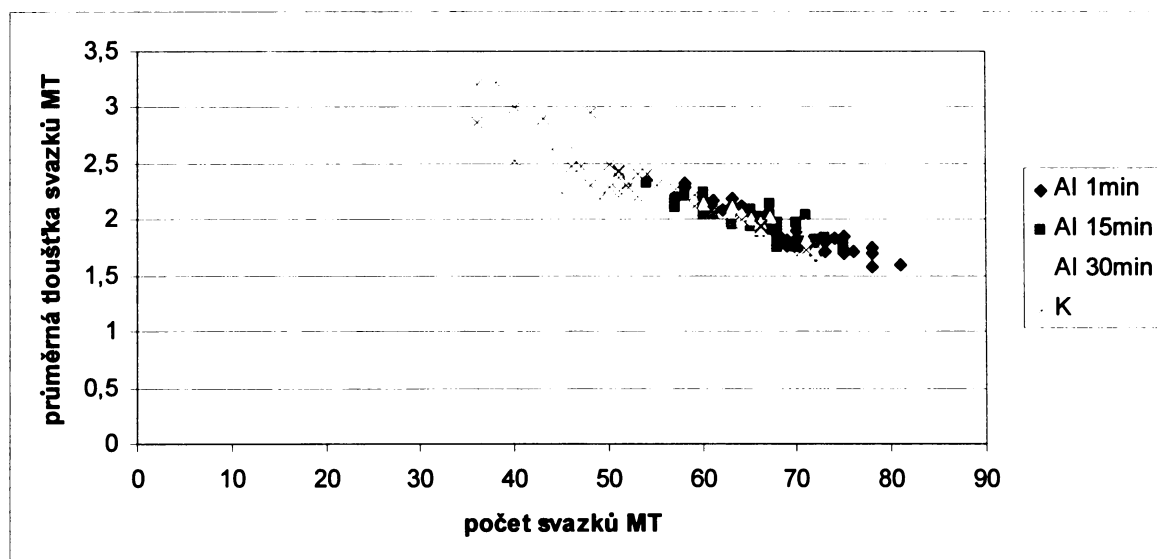
Graf 4.11 Průměrný počet mikrotubulárních svazků na 15 μm v jednotlivých hodnocených variantách. (chybová úsečka = směrodatná odchylka)

	AI1	AI15	AI30	GdAI1	GdAI15	GdAI30	GdGlu1	GdGlu15	GdGlu30	GdpH1	GdpH15	GdpH30	Glu1	Glu15	Glu30	K	KGd	pH1	pH15	pH30
AI1	-	n	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	n	a	a	n	n	n
AI15	n	-	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	a	a	a	a	n
AI30	n	n	-	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	a	a	a	n	n
GdAI1	a	a	a	-	n	n	n	n	n	n	n	n	a	a	a	n	n	a	a	a
GdAI15	a	a	a	n	-	n	n	n	n	n	n	n	a	a	a	n	n	a	a	a
GdAI30	a	a	a	n	n	-	n	n	n	n	n	n	a	a	a	n	n	a	a	a
GdGlu1	a	a	a	n	n	n	-	n	n	n	n	n	a	a	a	n	n	a	a	a
GdGlu15	a	a	a	n	n	n	n	-	n	n	n	n	a	a	a	n	n	a	a	a
GdGlu30	a	a	a	n	n	n	n	n	-	n	n	n	a	a	a	n	n	a	a	a
GdpH1	a	a	a	n	n	n	n	n	n	-	n	n	a	a	a	a	n	a	a	a
GdpH15	a	a	a	n	n	n	n	n	n	n	-	n	a	a	a	a	n	a	a	a
GdpH30	a	a	a	n	n	n	n	n	n	n	n	-	a	a	a	n	n	a	a	a
Glu1	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	-	n	a	a	a	n	n	n
Glu15	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	-	a	a	a	n	n	n
Glu30	n	n	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	-	a	a	a	n	n
K	a	a	a	n	n	n	n	n	n	a	a	n	a	a	a	-	n	a	a	a
KGd	a	a	a	n	n	n	n	n	n	n	n	n	a	a	a	n	-	a	a	a
pH1	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	a	a	a	-	n	n
pH15	n	a	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	n	a	a	n	-	n
pH30	n	n	n	a	a	a	a	a	a	a	a	a	n	n	n	a	a	n	n	-

Tab. 4.6 Statistické hodnocení rozdílů počtů MT na 15 μm mezi jednotlivými variantami; a=varianty se od sebe signifikantně liší, n=varianty se od sebe signifikantně neliší.

Celkové hodnocení průměrných počtů MT svazků na úseku 15 μm u jednotlivých imunofluorescenčně značených variant (viz Graf 4.11)

Vzhledem k nedostatečné kvalitě výstupů z mikroskopického pozorování GFP-tubulin exprimujících rostlin bylo hodnocení počtů MT a jejich relativních tloušťek prováděno na základě imunofluorescenčního značení MT (viz kap. 3.5). Průměrné počty mikrotubulárních svazků (viz Graf 4.11) se u kořenů ošetřovaných 100 μM AlCl_3 (v 1% sacharóze, pH=4,3) zvyšují o 18-22% proti kontrole. Stejně tak je zvýšený počet svazků MT u kořenů vystavených působení 5mM glutamátu (v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) a sníženého pH (1% sacharóza, pH=4,3) o 18-32%. Po 15 minutách působení glutamátu se počty MT liší od počtů MT po 15 minutách působení Al^{3+} . Zároveň se liší od počtů MT po 30 minutách působení glutamátu (viz Tab. 4.6). Tyto odlišnosti jsou však s nejvyšší pravděpodobností zapříčiněny horší kvalitou podkladů pro hodnocení. Po 30 minutách působení glutamátu se počty MT svazků neliší od počtů MT svazků po 30 minutách působení Al^{3+} . Po působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) a dalším následném působení, ať již Al^{3+} , glutamátu či sníženého pH, se jednotlivé varianty od sebe signifikantně neliší (viz Tab. 4.6).

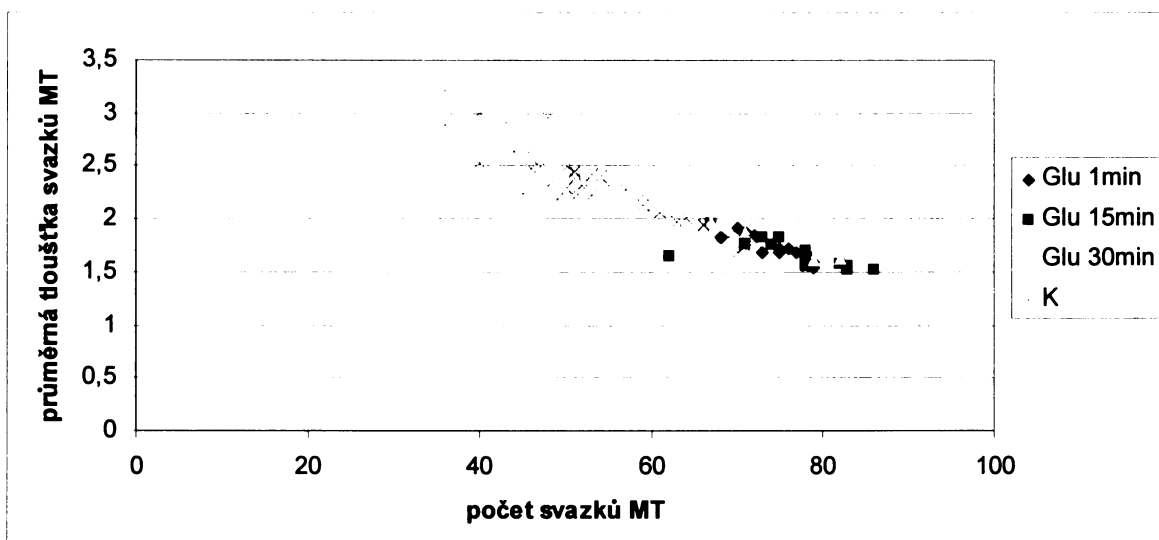


Graf 4.12 Závislost průměrné relativní tloušťky svazků mikrotubulů na jejich počtu po působení Al^{3+}

Hodnocení vlivu Al^{3+} na závislost počtů a relativních tlouštěk svazků MT (viz Graf 4.12)

Na základě hodnocení počtů a relativní tloušťky MT po působení $100\mu M AlCl_3$ (v 1% sacharóze, $pH=4,3$) bylo zjištěno následující. Za krátkodobého působení Al^{3+} nedochází pravděpodobně k depolymeraci mikrotubulů, pouze k rozpouštění jejich svazků na větší počet tenčích. Lze tak usuzovat z faktu, že závislost zvyšujícího se počtu svazků MT na klesající tloušťce je stejná u kontroly, kde se za normálních podmínek také vyskytují tenčí svazky, i u variant ovlivněných působením Al^{3+} (viz Graf 4.12). Je možné, že reorganizace spočívá v rozštěpení silných mikrotubulárních svazků na větší počet svazků o menší tloušťce. Pro názornost uveďme příklad: z jednoho silného svazku vznikají dva svazky o poloviční tloušťce, z původního jednoho tlustého nevzniká tedy depolymerací jednotlivých MT ve svazku pouze jeden tenčí svazek. Síla za působení Al^{3+} vzniklých svazků odpovídá síle nejtenčích svazků v kontrolní variantě, v některých případech se dokonce tvoří svazky tenčí, než je běžné za normálních okolností (viz Graf 4.12).

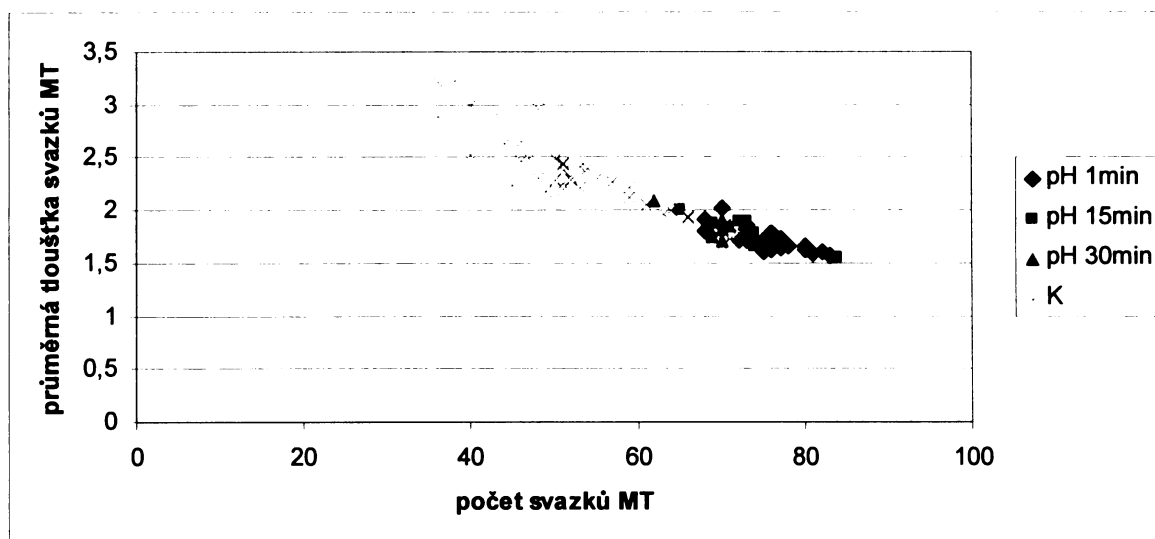
Změny oproti kontrole nastávají již po 1 minutě působení Al^{3+} , v průběhu dalších 30 minut působení zůstávají změny v uspořádání mikrotubulárních svazků oproti kontrole zachovány, nenastávají tedy další změny oproti 1 minutě působení.



Graf 4.13 Závislost průměrné relativní tloušťky svazků mikrotubulů na jejich počtu po působení glutamátu

Hodnocení vlivu glutamátu na závislost počtů a relativních tlouštěk svazků MT (viz Graf 4.13)

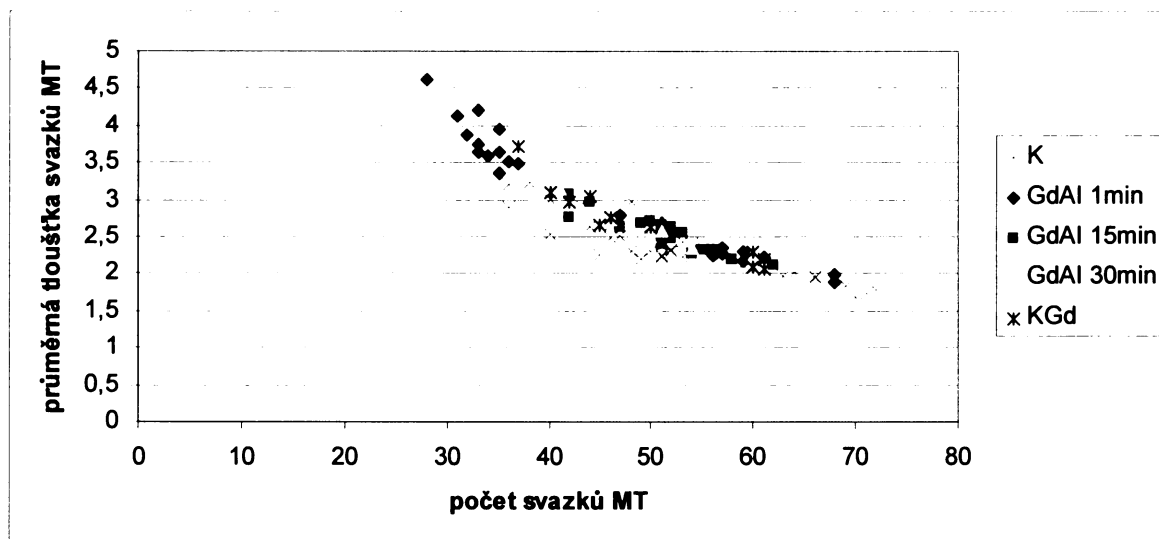
Za krátkodobého působení 5mM glutamátu (v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) rovněž dochází ke ztenčování a zvyšování počtu mikrotubulárních svazků oproti kontrole (viz Graf 4.13, Graf 4.11). Nedochozí k depolymeraci mikrotubulů, pouze k rozpouštění jejich svazků (vysvětlení viz výše). Nutno podotknout, že vzhled mikrotubulů po působení glutamátu se liší od MT ovlivněných Al^{3+} , nejsou pravidelně rovnoběžně uspořádané (viz Obr. 4.15, Obr. 4.11).



Graf 4.14 Závislost průměrné relativní tloušťky svazků mikrotubulů na jejich počtu po působení sníženého pH

Hodnocení vlivu sníženého pH na závislost počtů a relativních tlouštěk svazků MT (viz Graf 4.14)

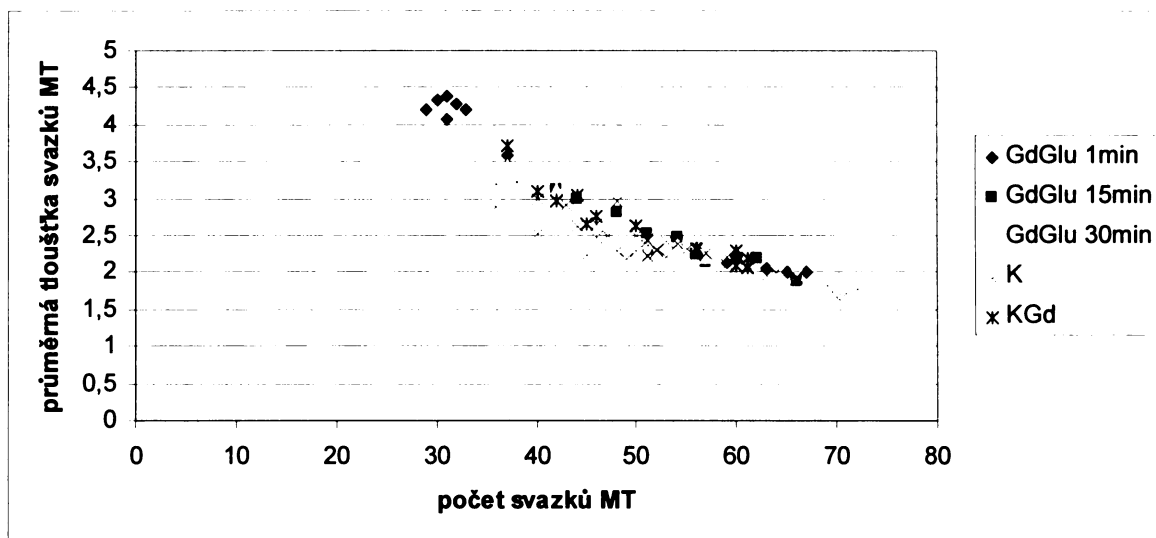
Působení nízkého pH (1% sacharóza, pH=4,3) již po 1 minutě způsobuje rovněž ztenčování MT za zvýšení jejich počtu (viz Graf 4.14, Graf 4.11). Po 15 a 30 minutách působení zůstávají MT ztenčené. Vzhledem ke stejné závislosti klesající relativní tloušťky na vzrůstajícím počtu svazků MT lze i zde usuzovat, že dochází k pouhému rozpouštění svazků na větší počet tenčích a nedochází k depolymeraci MT. Po 1, 15 i 30 minutách působení sníženého pH panuje v počtech i tloušťce MT takřka jednota, tyto jednotlivé varianty se od sebe výrazně neliší (viz Tab. 4.6, Graf 4.14).



Graf 4.15 Závislost průměrné relativní tloušťky svazků mikrotubulů na jejich počtu po působení gadolinia a následném působení Al^{3+}

Hodnocení vlivu gadolinia a následného působení Al^{3+} na závislost počtů a relativních tloušťek svazků MT (viz Graf 4.15)

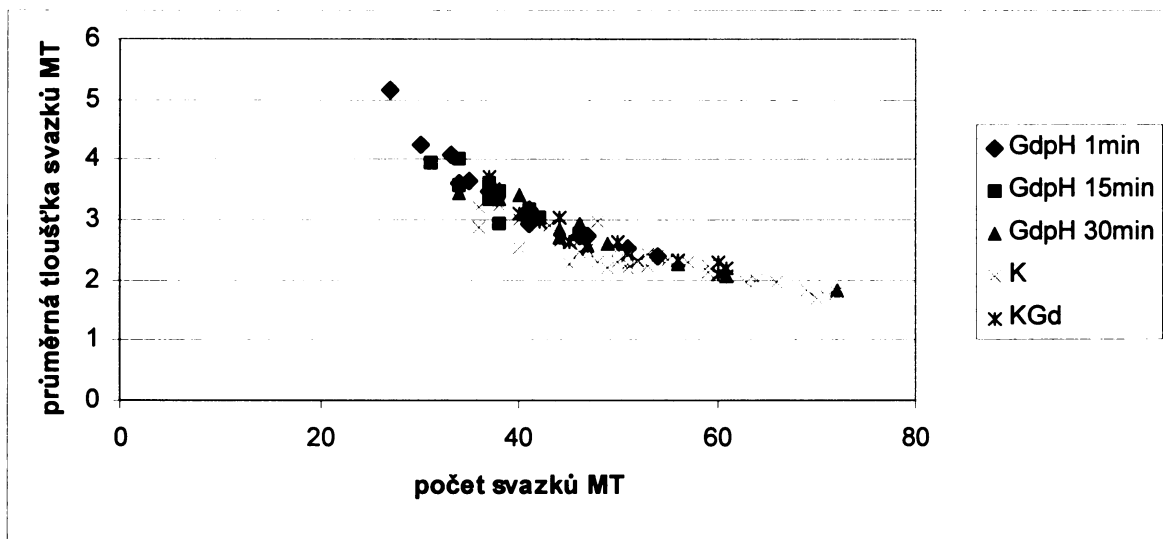
Po 1 hodině působení gadolinia (KGd) ($100 \mu M GdCl_3$ v 1% sacharóze, $pH=5,5-6,0$) nedochází ke statisticky významným změnám v počtech a relativní tloušťce mikrotubulárních svazků v buňkách oproti kontrole (K, viz Graf 4.15), ačkoli grafické znázornění naznačuje u KGd nepřítomnost buněk s výrazně početnějšími a tenčími svazky, které se vyskytují u kontrolní varianty. Po následném působení $100 \mu M AlCl_3$ (v 1% sacharóze, $pH=4,3$) rozhodně nedochází ke zvyšování počtu a snižování relativní tloušťky MT, jak je tomu u mikrotubulárních svazků po samotném působení Al^{3+} . Buňky si zachovávají rozmanitost v různých počtech a relativních tloušťkách svazků MT.



Graf 4.16 Závislost průměrné relativní tloušťky svazků mikrotubulů na jejich počtu po působení gadolinia a následném působení glutamátu

Hodnocení vlivu gadolinia a následného působení glutamátu na závislost počtů a relativních tlouštěk svazků MT (viz Graf 4.16)

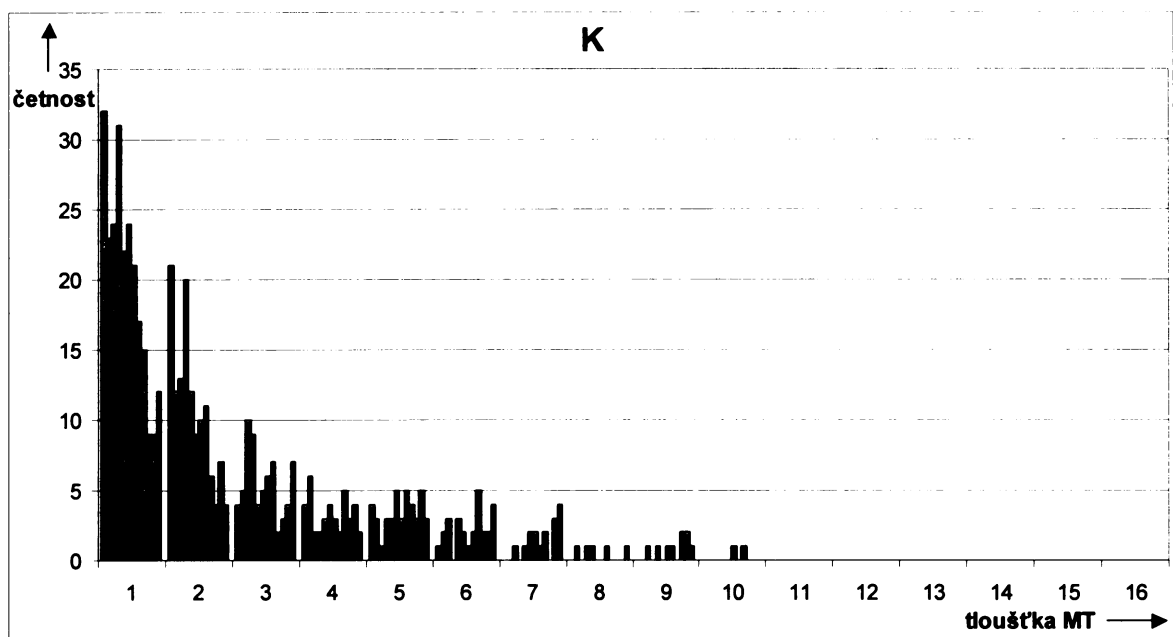
Podobně nebyly zaznamenány změny v následném působení 5mM glutamátu (GdGlu) (v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) (viz Graf 4.16) po 1 hodině působení gadolinia (100 μ M GdCl₃ v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0). Nedochozí ke ztenčování mikrotubulárních svazků za zvyšování jejich počtů oproti kontrole (K) ani oproti samotnému působení gadolinia po dobu 1 hodiny (KGd) a je taktéž zachována rozmanitost jejich četností a relativních tlouštěk MT v buňkách.



Graf 4.17 Závislost průměrné relativní tloušťky svazků mikrotubulů na jejich počtu po působení gadolinia a následném působení sníženého pH

Hodnocení vlivu gadolinia a následného působení sníženého pH na závislost počtů a relativních tlouštěk svazků MT (viz Graf 4.17)

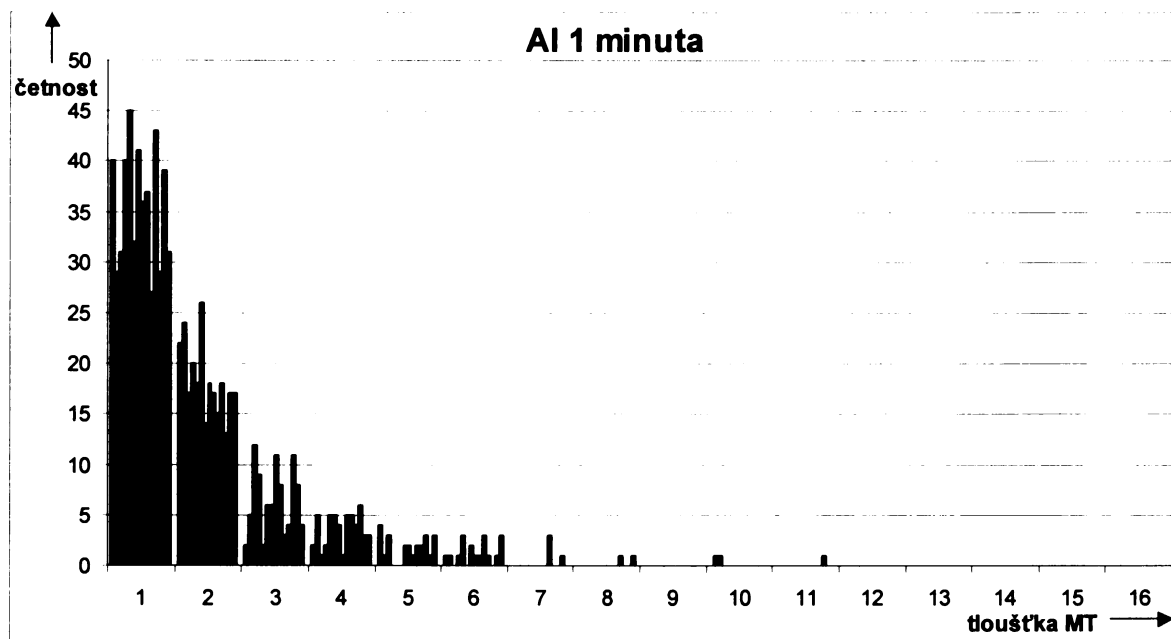
Nebyly zaznamenány změny v následném působení sníženého pH (1% sacharóza, pH=4,3) po 1 hodině působení gadolinia (GdpH) (100 μ M GdCl₃ v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0) (viz Graf 4.17). Nedochozí ke ztenčování mikrotubulárních svazků za zvyšování jejich počtů oproti kontrole (K) ani oproti samotnému působení gadolinia po dobu 1 hodiny (KGd) a je taktéž zachována rozmanitost jejich četností a relativních tlouštěk MT v buňkách.



Graf 4.18 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách u kontrolní varianty

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách u kontroly

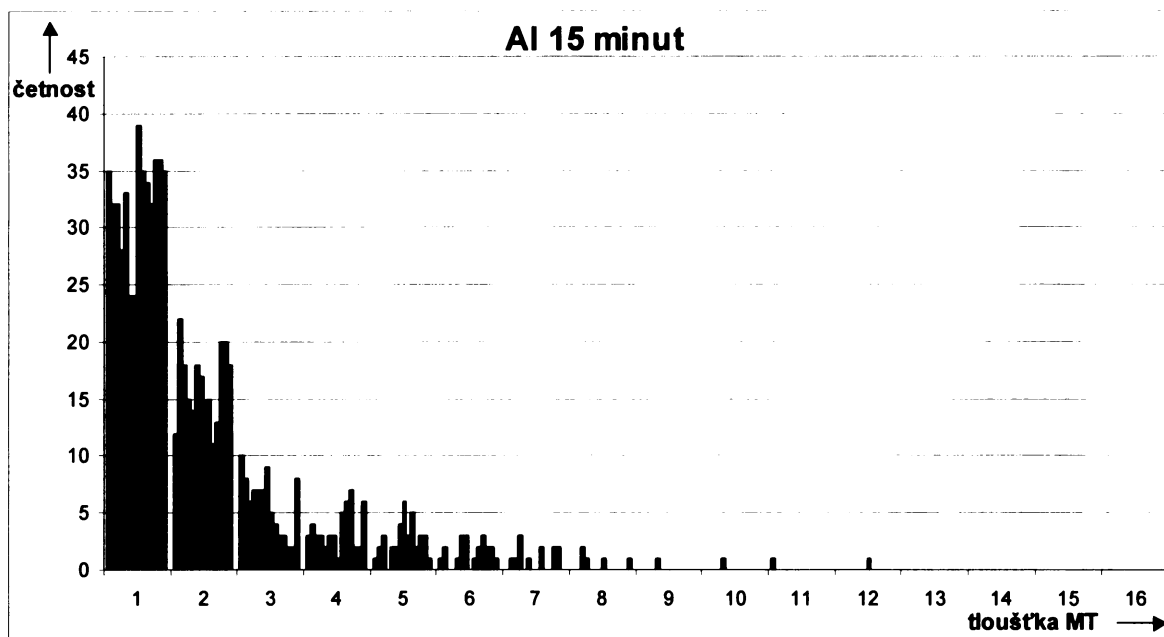
U kontrolní varianty bez jakéhokoli působení (viz Graf 4.18) je u jednotlivých buněk výrazně nižší počet nejtenčích MT (relativní tloušťka 1, 2) oproti působení Al^{3+} , glutamátu a sníženého pH (viz níže). Četnosti se oproti působení Al^{3+} zvyšují u silnějších svazků (relativní tloušťka 5 a výše) na úkor svazků slabších.



Graf 4.19 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 1 minutě působení Al³⁺

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách po 1 minutě působení Al³⁺

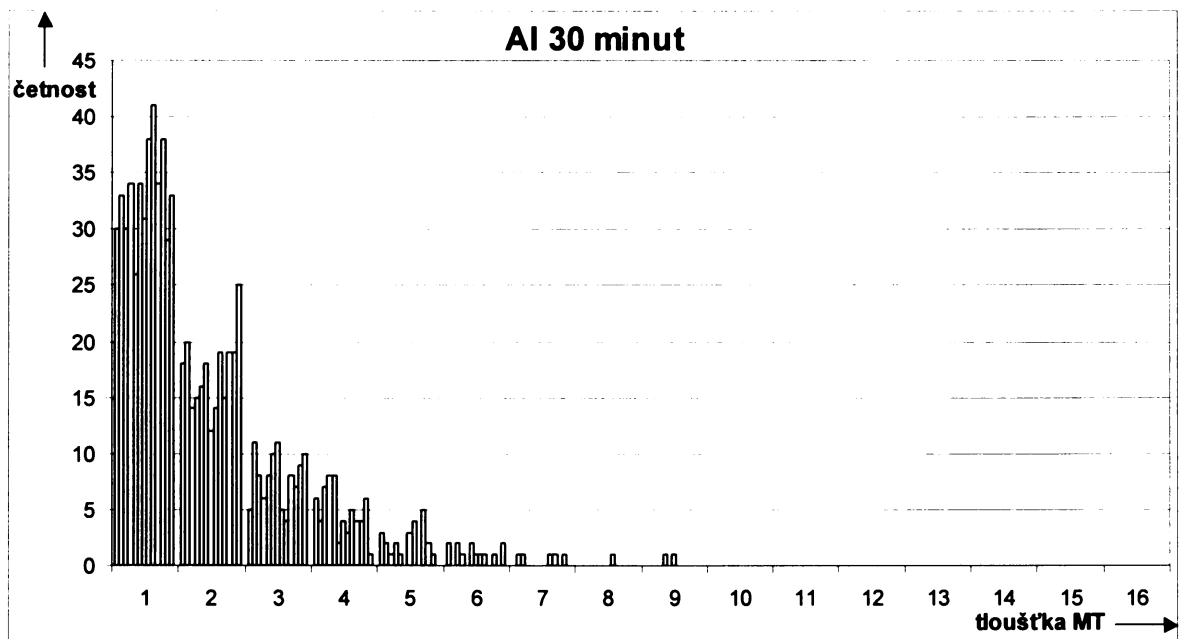
Po 1 minutě působení 100μM AlCl₃ (v 1% sacharóze, pH=4,3) se v jednotlivých hodnocených buňkách počet nejtenčích svazků zvyšuje oproti kontrole, zároveň je po 1 minutě působení oproti kontrole snížený počet svazků o relativní tloušťce 5 a výše (viz Graf 4.19).



Graf 4.20 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 15 minutách působení Al³⁺

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách po 15 minutách působení Al³⁺

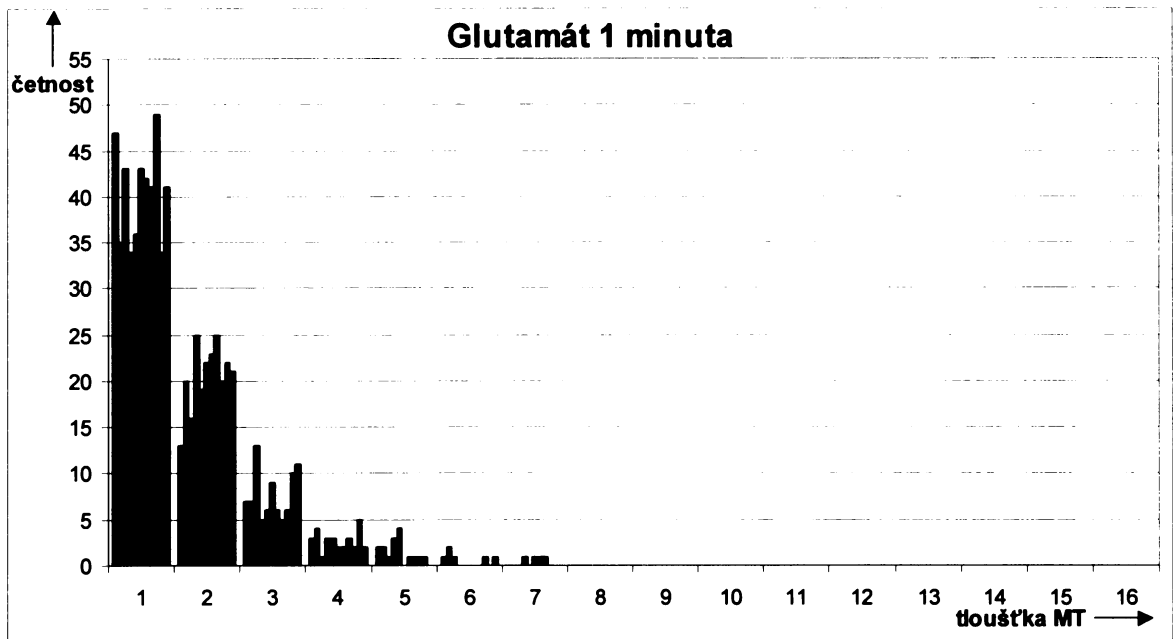
Po 15 minutách působení 100μM AlCl₃ (v 1% sacharóze, pH=4,3) je zvýšený počet nejtenčích svazků MT oproti kontrole a mírně se rozšiřuje různorodost tlouštěk svazků směrem k silnějším oproti 1 minutě působení Al³⁺ (viz Graf 4.20).



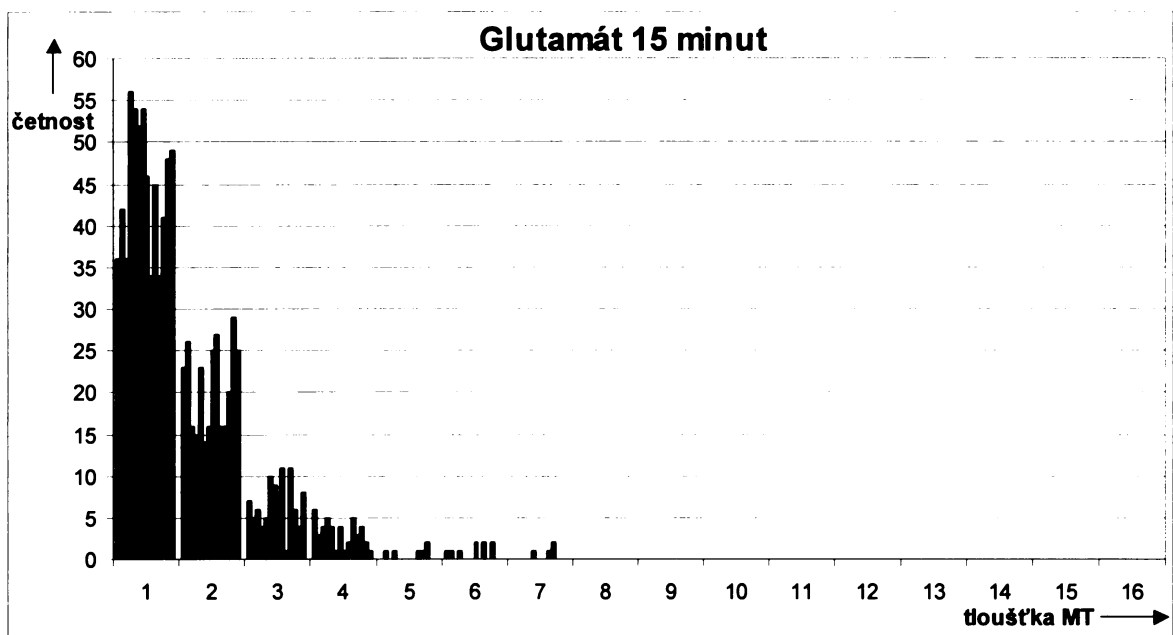
Graf 4.21 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 30 minutách působení Al^{3+}

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách po 30 minutách působení Al^{3+}

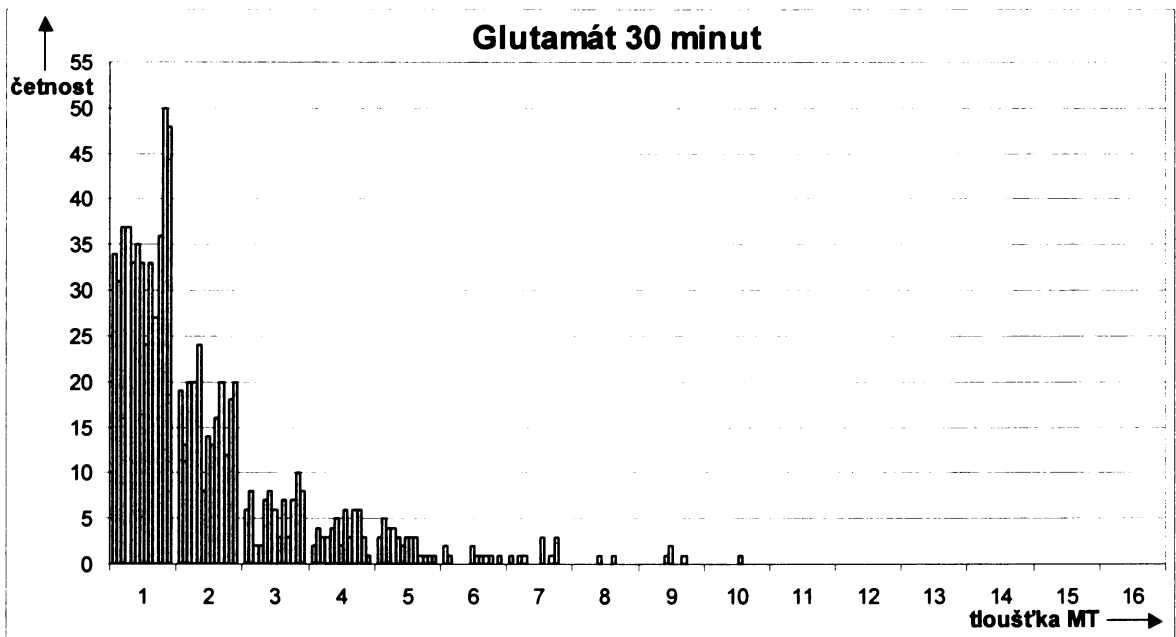
Po 30 minutách působení $100\mu M AlCl_3$ v 1% sacharóze o $pH=4,3$ je zvýšený počet nejtenčích svazků MT oproti kontrole a zároveň se oproti kontrole snižuje počet svazků s relativní tloušťkou 5 a více (viz Graf 4.21).



Graf 4.22 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 1 minutě působení glutamátu



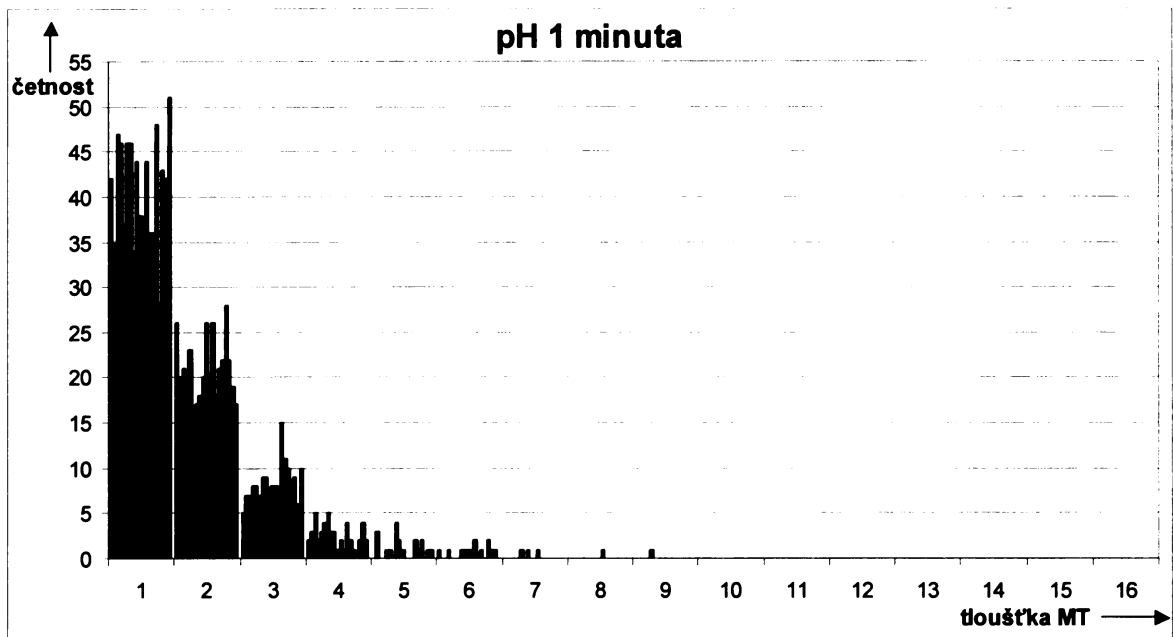
Graf 4.23 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 15 minutách působení glutamátu



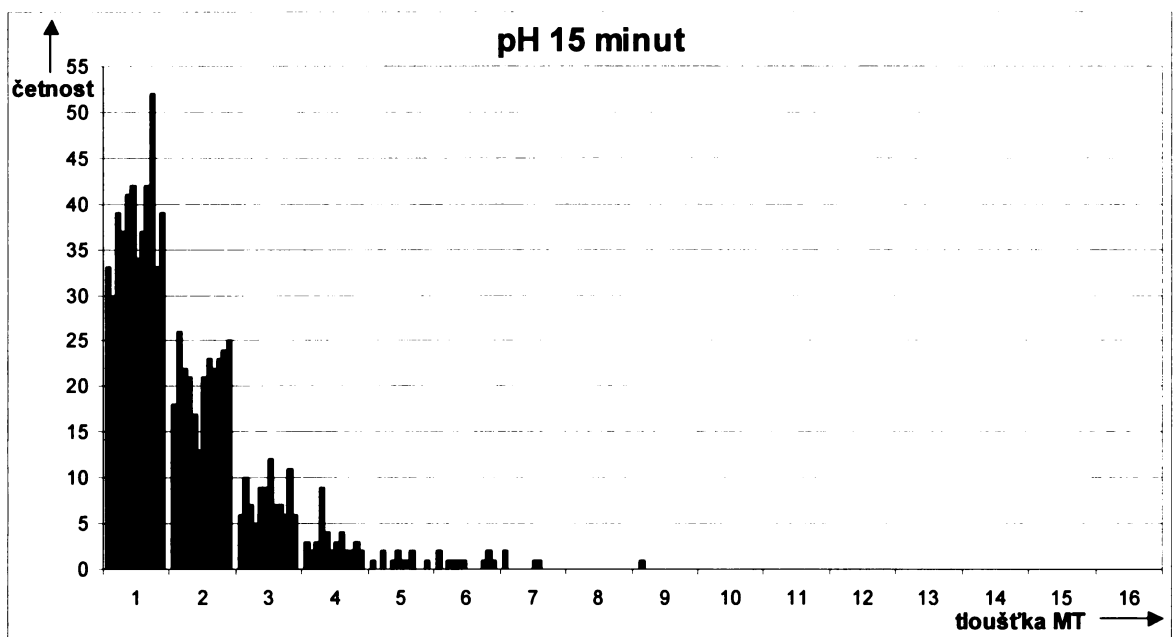
Graf 4.24 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 30 minutách působení glutamátu

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách po 1, 15 a 30 minutách působení glutamátu

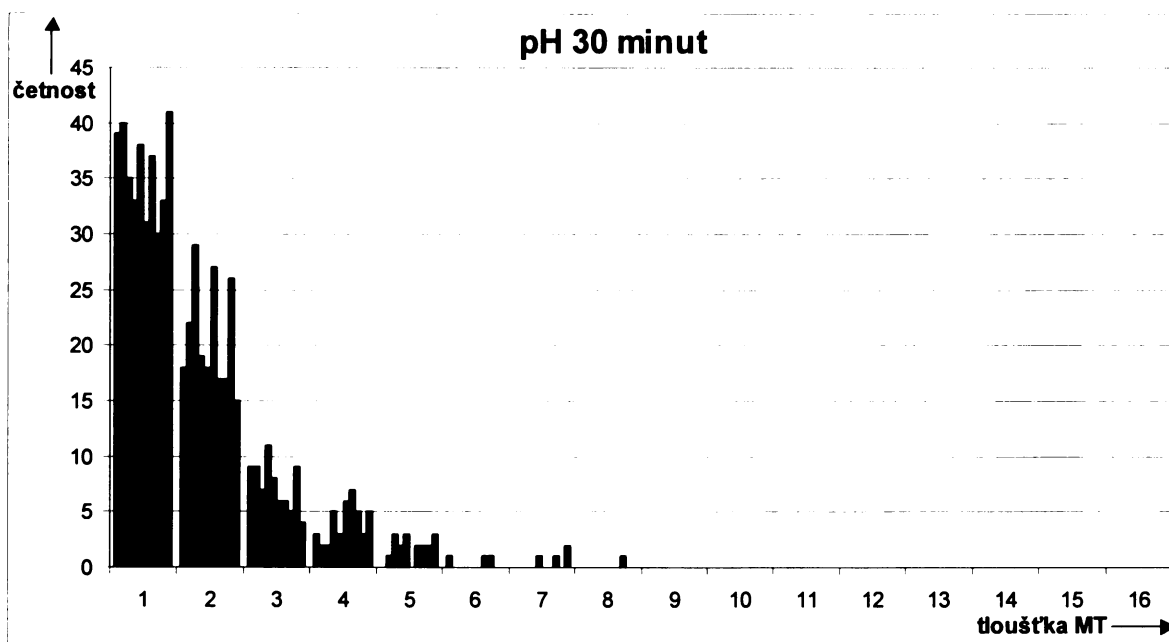
Působení 5mM glutamátu v 1% sacharóze, pH=5,5-6,0 po dobu 1 minuty (viz Graf 4.22), 15 minut (viz Graf 4.23) a 30 minut (viz Graf 4.24). Z hodnocení četnosti a relativních tlouštěk mikrotubulárních svazků vyplývá, že jsou glutamátem stejně jako Al^{3+} výrazně ovlivněny. Jejich počet se zvyšuje oproti kontrole a zároveň se snižuje jejich relativní tloušťka ve všech časech působení glutamátu. Zvyšuje se počet nejtenčích svazků MT oproti kontrole a zároveň se oproti kontrole snižuje počet svazků s relativní tloušťkou 5 a více.



Graf 4.25 Čtenost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 1 minutě působení sníženého pH



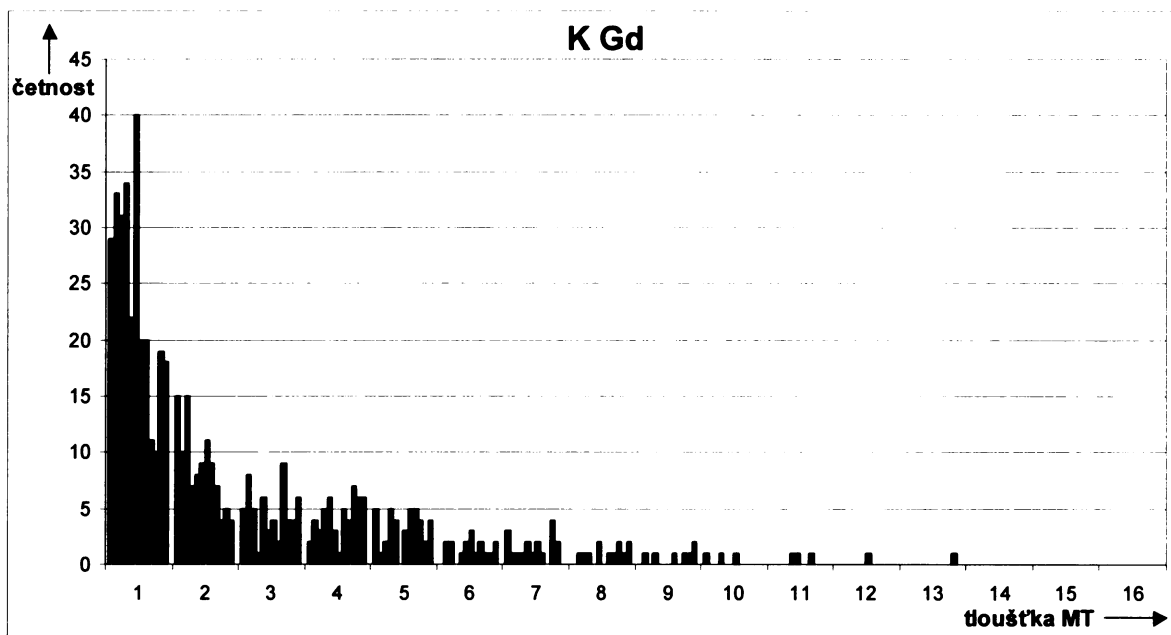
Graf 4.26 Čtenost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 15 minutách působení sníženého pH



Graf 4.27 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 30 minutách působení sníženého pH

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách po 1, 15 a 30 minutách působení sníženého pH

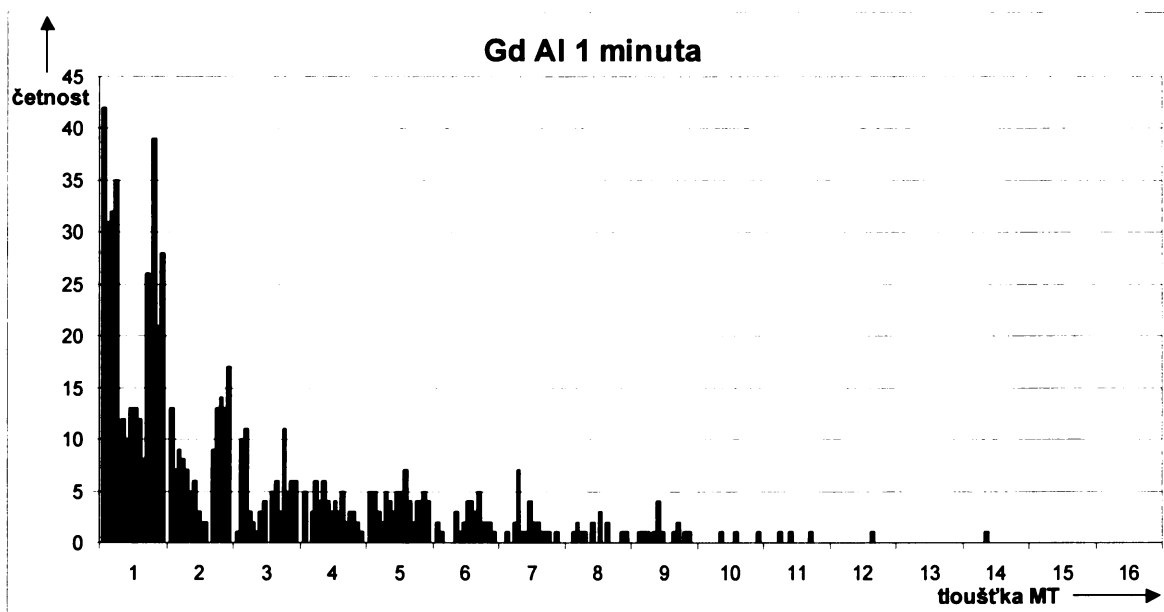
Taktéž snížené pH (4,3 v 1% sacharóze) po 1 minutě (viz Graf 4.25), 15 minutách (viz Graf 4.26) a 30 minutách (viz Graf 4.27) působení má vliv na organizaci mikrotubulárních svazků v buňce. Oproti kontrole dochází ke zvyšování počtu a snižování jejich tloušťky. Zvyšuje se počet nejtenčích svazků MT oproti kontrole a zároveň se oproti kontrole snižuje počet svazků s relativní tloušťkou 5 a více.



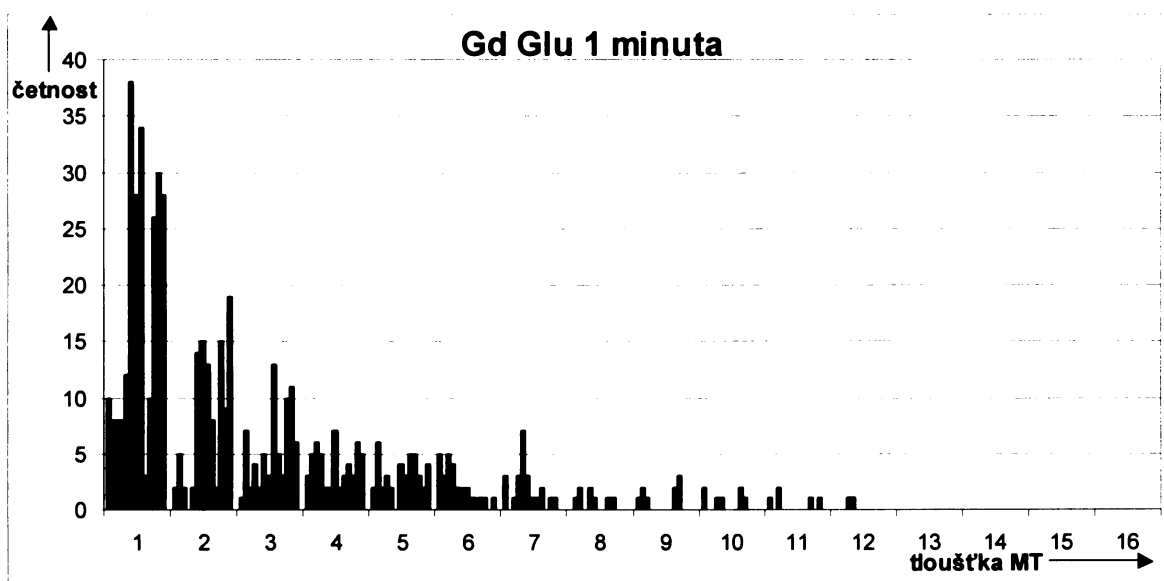
Graf 4.28 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 1 hodině působení gadolinia

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách po 1 hodině působení gadolinia

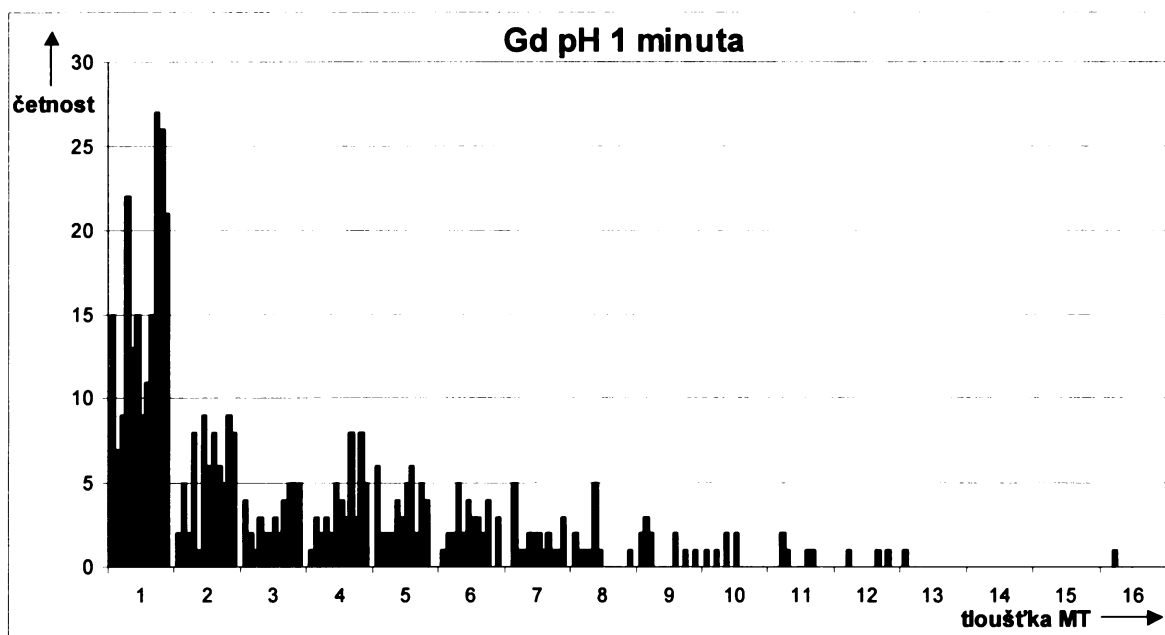
Po 1 hodině působení gadolinia (100 μM GdCl_3 v 1% sacharóze, $\text{pH}=5,5-6,0$) se tloušťka i četnosti mikrotubulárních svazků podobají kontrolní variantě (viz Graf 4.28, Graf 4.18). Mikrotubulární svazky mají širší spektrum relativních tlouštěk, ve větší míře jsou zde zastoupeny svazky o relativní tloušťce 7 a více, než je tomu u variant s působením Al^{3+} , glutamátu a sníženého pH . Naopak svazky o menší relativní tloušťce jsou oproti těmto variantám zastoupeny méně.



Graf 4.29 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 1 hodině působení gadolinia a 1 minutě následného působení Al^{3+}



Graf 4.30 Četnost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 1 hodině působení gadolinia a 1 minutě následného působení glutamátu



Graf 4.31 Čtenost svazků mikrotubulů o dané relativní tloušťce v jednotlivých hodnocených buňkách po 1 hodině působení gadolinia a 1 minutě následného působení sníženého pH

Četnosti svazků MT o jednotlivých relativních tloušťkách po 1 hodině působení gadolinia a následném působení Al^{3+} , glutamátu či sníženého pH

Vzhledem k tomu, že grafy zaznamenávající četnost různě silných svazků MT po působení gadolinia a následném působení Al^{3+} , glutamátu a sníženého pH ve všech časech jsou téměř identické, jsou na ukázkou zobrazeny pouze tři z nich (viz Graf 4.29, Graf 4.30, Graf 4.31). Ve všech časech a po všech ošetřeních se vyskytují s vysokou četností silné mikrotubulární svazky, stejně jako je tomu u kontroly (K) a kontrolní varianty s působením gadolinia (KGd).

5 Diskuze

5.1 Hodnocení růstu kořene

Mým úkolem bylo sledovat změny mikrotubulárního cytoskeletu v *Arabidopsis thaliana* za krátkodobého působení Al^{3+} a zjistit, zda při odpovědích MT na stres vyvolaný Al^{3+} hraje roli MAP65-1, protein asociovaný s mikrotubuly. Je známo, že kortikální MT jsou jedním z prvních cílů působení Al^{3+} . Vzhledem k velmi rané reakci MT na Al^{3+} se můžeme domnívat, že přítomnost Al^{3+} spouští v buňkách signální kaskádu, na níž se kortikální MT podílejí. Poněvadž byla ověřována účast MT v signalizaci, tedy v událostech odehrávajících se v organismu v krátkém časovém úseku po jeho vystavení působícímu podnětu, byly v diplomové práci studovány reorganizace MT záhy po vystavení buněk kořenů působení Al^{3+} , jmenovitě již po 1-5 minutách. Následné změny v organizaci kortikálních MT byly sledovány v časovém horizontu 30 minut. Dále byla ověřována reakce MT na působení glutamátu. Glutamát se dle Sivagurua *et al.* (2003b) účastní signální dráhy spouštěné Al^{3+} vedoucí k reorganizaci MT. Zablokováním Ca^{2+} kanálů gadolinem je dále dle autorů zabráněno průběhu této signální dráhy a následné působení Al^{3+} či glutamátu nezpůsobuje reorganizaci MT. Proto byl v diplomové práci ověřován i vliv gadolinia s následným působením Al^{3+} či glutamátu na kortikální MT.

Předtím, než bylo možno přistoupit k hodnocení změn na úrovni mikrotubulárního cytoskeletu v kořenech, bylo nutno otestovat reakci kořenů *Arabidopsis thaliana* na toxické působení hlinitých iontů z hlediska jejich růstu. Svou diplomovou prací navazují na práci Schwarzerové *et al.* (2002), kde byl testován vliv $100\mu\text{M}$ Al^{3+} na buňky BY-2. Stejná koncentrace byla používána i v dalších studiích (Sivaguru *et al.*, 2003a, Sivaguru *et al.*, 2003b), v nichž bylo zjištěno, že efektivně potlačuje růst kořenů *Arabidopsis*, a je tedy vhodnou koncentrací pro výzkum mechanismu působení Al^{3+} . Kromě vlivu samotného Al^{3+} byl v růstových analýzách testován i vliv glutamátu, který se podle literatury může účastnit signální dráhy spouštěné Al^{3+} , a též vliv některých cytoskeletálních drog na inhibici růstu kořene způsobenou Al^{3+} . Vzhledem k tomu, že přítomnost jiných kationtů (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Na^+) v médiu může zmírňovat toxické působení Al^{3+} (Kinraide *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1997), byly testované látky rozpouštěny v roztoku 1% sacharózy bez dalších příměsí. Bylo tak zajištěno, že výsledný růst kořenů vypovídá pouze o vlivu testovaných látek a zároveň bylo zabráněno možnosti vysrážení Al^{3+} fosfátem (Heim *et al.*, 1999). Zvlášť byl ověřován zmírňující efekt Ca^{2+} iontů na růst kořenů za i bez přítomnosti Al^{3+} v médiu. Rostliny *Arabidopsis* byly kultivovány v tekutém médiu, aby byl zajištěn

rovnoměrný přístup působících látek ze všech stran kořene, což při kultivaci na agarové plotně zajistit nemůžeme.

Při základních analýzách růstu byly hodnoceny délky kořenů kultivovaných v různých médiích. Jednak bylo prováděno měření během 24 hodin (6, 12, 24 hod.), jednak po 4 dnech kultivace. Ukázalo se, že růst kořenů v médiu se $100\mu\text{M Al}^{3+}$ je zcela potlačen, délky kořenů kultivovaných v médiu s Al^{3+} se statisticky neliší od délek počátečních. V literatuře byl za této koncentrace zjištěn nárůst délky kořenů po 12 hodinách o 2 mm (Sivaguru *et al.*, 2003a), během 24 hodin o zhruba 6 mm (Sivaguru *et al.*, 2003b). Tyto rozdíly jsou zřejmě dány experimentálním provedením. Autoři používali jednak média s Al^{3+} o odlišném pH (4,0 či 4,5), jednak jejich média obsahovala částečně růstové médium. Je známo, že jiné kationty mají zmírňující účinek při toxickém působení Al^{3+} a růst kořenů je potlačován méně (Kinraide *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1997). Dále je možné, že fosfáty obsažené v růstovém médiu vysrážely Al^{3+} , tedy jeho reálná koncentrace v médiu byla snížena (Heim *et al.*, 1999).

Zajímavé bylo zjištění, že Ca^{2+} nemá zmírňující účinek na toxické působení Al^{3+} u *Arabidopsis*. Délky kořenů z média s Al^{3+} se neliší od kořenů z média s Al^{3+} a Ca^{2+} . U pšenice byl naopak zjištěn pozitivní efekt Ca^{2+} iontů na růst kořenů v médiu s Al^{3+} (Kinraide *et al.*, 1992; Kinraide a Parker, 1987). Tím, že dodáme do média Ca^{2+} , bychom teoreticky měli bránit hlinitým iontům ve vytěsňování Ca^{2+} z jeho fyziologicky významných míst v apoplastu. Hypotéza o vytěsňování Ca^{2+} iontů z jejich vazebných míst hlinitými ionty jako jediné příčině zastavení růstu však již byla zpochybňována (Ryan *et al.*, 1997) a mé výsledky u rostlin *Arabidopsis* naznačují totéž.

U rostlin z varianty se sníženým pH se délky kořenů neliší od kontrolních. Nebyl vysledován pozitivní efekt pH na růst kořenů, jaký pozorovala např. Raimanová (2001) u zblochanu a rákosu, ani úplné zastavení růstu (Koyama *et al.*, 2001). Koyama *et al.* (2001) pozorovali u *Arabidopsis thaliana* po 1-2 hodinách působení sníženého pH (4,5-4,7) ztrátu viability u prodlužovací zóny kořene a rostoucích laterálních kořenů. Ztráta viability se stávala nevratnou již po 1 hodině působení sníženého pH. Znamená to, že námi zvolené pH (4,3) je vhodné pro studium toxicity Al^{3+} , neboť samotné pH nepotlačuje růst kořenů a zároveň je to pH, při kterém je většina přítomného hliníku ve formě toxických Al^{3+} .

V mém případě se délky kořenů kultivovaných za sníženého pH neliší od kontrolních. Taktéž se neliší délky kořenů z média se sníženým pH od délek kořenů z varianty s Ca^{2+} a sníženým pH. Ca^{2+} tedy ani v tomto případě nemá pozitivní vliv na růst

kořenů, jaký za působení sníženého pH na růst kořenů *Arabidopsis* zjistili Koyama *et al.* (2001).

Dále byly sledovány i délky kořenů po 4 dnech kultivace v médiu s 5mM glutamátem. Sivaguru *et al.* (2003b) formulovali hypotézu o reakci kortikálních mikrotubulů na Al^{3+} zprostředkované glutamátem. Glutamát se dle hypotézy účastní signální dráhy spouštěné Al^{3+} . V přítomnosti Al^{3+} se otevírá glutamátový kanál, glutamát se vylévá z cytosolu a extracelulárně působí na vápenatý kanál. Vápenatý kanál se po navázání glutamátu otevře, a umožní tak tok Ca^{2+} do cytosolu. Zvýšená hladina cytosolického Ca^{2+} způsobí depolymeraci mikrotubulů. Moje výsledky však údaje Sivaguru *et al.* (2003b) nepotvrzují. Vliv glutamátu na růst kořenů není tak dramatický jako vliv Al^{3+} . Růst kořenů kultivovaných v glutamátu je sice oproti kontrolním kořenům potlačen, nicméně zdaleka není srovnatelný s úplnou inhibicí růstu, která nastává u kořenů kultivovaných v médiu s Al^{3+} . Ani vyšší koncentrace glutamátu nezpůsobují úplné zastavení růstu kořenů, jak je vidět z literatury (Sivaguru *et al.*, 2003b). Je tedy zřejmé, že v signální dráze spouštěné Al^{3+} vedoucí k zástavě růstu kořene není glutamátový receptor buď uplatňován vůbec, nebo jen částečně, a není tedy hlavním signálním komponentem. Tyto výsledky souvisí i s výsledky mikroskopických pozorování. Mikrotubuly byly glutamátem ovlivněny jinak než Al^{3+} , byly reorganizovány jiným způsobem než po působení Al^{3+} . Zřejmě proto bylo i potlačení růstu kořenů pouze částečné. Na základě imunofluorescenčního značení mikrotubulů i GFP-MAP65-1 se taktéž projevilo odlišné působení Al^{3+} a glutamátu.

Oryzalin a taxol

Ověřovala jsem dále hypotézu, podle které jsou změny v uspořádání MT cytoskeletu spouštěčem signálu za působení Al^{3+} . Signalizaci by tak teoreticky bylo možno ovlivnit působením na stabilitu MT. Proto jsem testovala vliv stabilizace (taxolem) a destabilizace MT (oryzalinem) na růst kořenů.

Na základě sledování růstu a vzhledu kořenů lze prohlásit, že obě použité cytoskeletální drogy (oryzalin i taxol) výrazně působí na růst i morfologii kořenů.

Taxol se váže na β -podjednotky tubulinu, zabraňuje depolymeraci mikrotubulů, a tím je stabilizuje. Taxol v 1 μM koncentraci sám o sobě nezpůsobuje snížení růstu kořenů oproti kontrole. Stabilizace mikrotubulů 1 μM koncentrací taxolu tedy nemá na rychlost růstu kořenů *Arabidopsis* vliv. Baskin *et al.* (1994) zjistili, že při vyšších koncentracích (10 μM) taxolu je růst kořenů pomalejší, ale neustává. Kořenové špičky v 1 μM taxolu

natékají v elongační zóně pouze v malé míře. S roustoucí koncentrací taxolu se zvyšuje i natékání kořenů, jež je ovšem omezeno na elongační zónu. V dělivé zóně kořen nenatéká ani za vyšších koncentrací taxolu (Baskin *et al.*, 1994). Kořenové vlášení je u rostlin kultivovaných v 1 μM taxolu hustší oproti kontrole. Při vyšších koncentracích taxolu zaznamenali Baskin *et al.* (1994) narušení morfologie kořenových vlásků.

Pakliže necháme 1 μM taxol působit po dobu 30 minut před přesunutím rostlin do média s Al^{3+} a taxolem, neprojeví se ani toto předchozí působení taxolu jako zmírnění následujícího toxického vlivu Al^{3+} . Přírůstky délek kořenů po 2 dnech kultivace jsou srovnatelné s přírůstky délek kořenů kultivovaných v médiu se samotným Al^{3+} . Pokud přeneseme rostliny rovnou do média s taxolem a Al^{3+} , jejich růst se ještě sníží oproti kořenům kultivovaným v samotném Al^{3+} . Je tedy zřejmé, že ani předchozí stabilizace mikrotubulů taxolem nezabrání průběhu signální kaskády spouštěné Al^{3+} , vedoucí k zastavení růstu. Možným vysvětlením je, že efekt Al^{3+} je následkem jeho působení i na jiné buněčné komponenty než mikrotubuly.

Oryzalin, cytoskeletální droga, která destabilizuje a depolymeruje mikrotubuly, má výrazný vliv na růst a morfologii kořenů. Za působení samotného oryzalinu (200 i 550nM) se délky kořenů po 1 i 2 dnech liší v rámci různých koncentrací oryzalinu i od kořenů kultivovaných v $\frac{1}{2}$ MS médiu, oproti nimž se růst sníží. Zároveň se ale zvýší ve srovnání s růstem kořenů kultivovaných v médiu s Al^{3+} . Depolymerace nebo destabilizace mikrotubulů způsobená oryzalinem tedy velmi potlačuje, ale nezastavuje růst kořenů zcela. Potlačení růstu kořenů je přímo úměrné koncentraci oryzalinu. Samotný oryzalin tedy způsobuje inhibici růstu kořene, průběh je však velmi odlišný od inhibice způsobené Al^{3+} . Kořeny ošetřené oryzalinem se během prvních 24 hodin částečně prodlužují, teprve poté nastává úplná inhibice růstu. Zde tkví rozdíl od Al^{3+} , které inhibují růst okamžitě.

Jsou-li kořeny vystaveny třicetiminutovému působení 200nM či 550nM oryzalinu před samotnou kultivací v médiu s Al^{3+} a oryzalinem současně, rychlost jejich růstu se statisticky neliší od kořenů kultivovaných v médiu se samotným Al^{3+} . Následné působení Al^{3+} , byť za přítomnosti 200nM či 550nM oryzalinu v médiu, je schopno potlačit i částečný růst kořene, ke kterému dochází za přítomnosti samotného oryzalinu. Je tedy zřetelné, že předchozí depolymerace mikrotubulů nemá zmírňující efekt na následující působení Al^{3+} . Přestože Al^{3+} nemůže působit na mikrotubuly, vyvolává v buňkách pochody vedoucí k zastavení růstu kořene, tyto pochody musí tedy být vyvolané jeho působením na jiné buněčné komponenty než MT.

Za působení oryzalinu byla ovlivněná i morfologie kořenů, a to očividně. Kořeny tloustnou v elongační i dělivé zóně v závislosti na koncentraci oryzalinu, zřejmě díky zakulacování a zvětšování jednotlivých buněk kořenové špičky a elongační zóny. Mohutnější depolymerace mikrotubulů způsobuje výraznější natékání. Ke stejným výsledkům došli i Baskin *et al.* (1994). V závislosti na koncentraci oryzalinu je ovlivněna i tvorba kořenového vlášení. Kořenové vlásy se tvoří ve 200nM oryzalinu na samé kořenové špičce, hned za kořenovou čepičkou. Vyšší koncentrace oryzalinu už tvorbě kořenového vlášení brání.

Je zajímavé, že Al^{3+} dokáže plně potlačit natékání kořenových špiček způsobené oryzalinem. Po třicetiminutovém působení oryzalinu, době, která postačí k depolymeraci mikrotubulů, a následné kultivaci v médiu s Al^{3+} i oryzalinem kořeny nenatékají. Může to znamenat, že Al^{3+} výrazně inhibuje anizotropní buněčný růst, avšak zřejmě ne prostřednictvím mikrotubulů.

5.2 Pozorování mikrotubulů a MAP65-1

Kortikální mikrotubuly jsou považovány za jeden z prvních cílů toxického působení Al^{3+} . Je dostatečně dobře známo, že dlouhodobé působení Al^{3+} ovlivňuje uspořádání mikrotubulů jak v buněčných suspenzích, tak v buňkách kořene. Po 6 hodinách působení Al^{3+} dochází k rozsáhlé depolymeraci mikrotubulů (Blancaflor *et al.*, 1998; Sivaguru *et al.*; 1999a; Sivaguru *et al.*, 1999b). U buněčných kultur tabáku BY-2 se během prvních hodin působení Al^{3+} o 20-25% zvýšil počet mikrotubulárních svazků za jejich současného ztenčení (Schwarzerová *et al.*, 2002). Nicméně změny v uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu v kortikální oblasti jsou pozorovatelné již během 30 minut působení Al^{3+} (Sivaguru *et al.*, 2003b). Sivaguru *et al.* (2003b) usoudili, že glutamátém řízený vápenatý kanál zprostředkuje reakci kortikálních mikrotubulů na Al^{3+} . Po navázání glutamátu se otevře vápenatý kanál a zvýšená hladina cytosolického Ca^{2+} způsobí depolymeraci mikrotubulů. Samotné Ca^{2+} depolymeruje kortikální mikrotubuly (Breviaro a Nick, 2000) a způsobuje stejné změny v uspořádání GFP-MBD jako Al^{3+} (Sivaguru *et al.*, 2003b). Problém je ale v propojení těchto dvou jevů a ve využití MBD jako součásti původně lidského proteinu pro pozorování u rostlin (viz níže).

Reorganizace cytoskeletu je zahrnuta mezi rané reakce na abiotický a biotický stres spolu se změnami membránového potenciálu a cytosolickou koncentrací druhých posílů (Thion *et al.*, 1996), a je tak součástí signálních drah v rostlinné buňce (Wasteneys, 2004).

Na základě velmi časných reakcí kortikálních MT je možno se domnívat, že mikrotubuly a jejich tranzientní reorganizace hraje významnou úlohu v buněčné signalizaci i za působení Al^{3+} .

Vzhledem k těmto poznatkům jsem se zaměřila na změny v organizaci mikrotubulárního cytoskeletu v kortikální oblasti, které nastávají záhy po vystavení kořene toxickým koncentracím Al^{3+} . Již po 1 minutě působení byl pozorován nárůst počtu mikrotubulárních svazků a jejich současné ztenčování; obdobný úkaz pozorovala Schwarzerová *et al.* (2002) během prvních hodin působení Al^{3+} na buněčných kulturách tabáku BY-2.

Je možné, že do změn v uspořádání kortikálních mikrotubulů a do signálních drah za působení Al^{3+} jsou zahrnuty i proteiny asociující s mikrotubuly (MAP). K testování tohoto předpokladu vybízí studie Sivagurua *et al.* (2003b). Autoři na kořenech *Arabidopsis* pozorovali po působení Al^{3+} změny v signálu GFP-MBD (domény vázající se na mikrotubuly, microtubule binding domain). MBD doména však pocházela z lidského MAP-4 proteinu, což už samo o sobě může být problematické, poněvadž změny v uspořádání původně rostlinného proteinu MAP65-1 se mohou lišit.

Jako problematický se též jeví závěr autorů Sivaguru *et al.* (2003b), že mizení signálu GFP-MBD po působení Al^{3+} znamená zároveň probíhající depolymeraci kortikálních mikrotubulů. Protein asociovaný s MT se může chovat odlišně než samotné mikrotubuly. Důkazem je mnou zjištěný fakt, že na samotných MT nejsou znatelné žádné změny po působení gadolinia a následném působení Al^{3+} , zatímco ke změně dochází u MAP65-1 (viz níže). Změny v lokalizaci proteinu MAP65-1 mohou nastávat dříve či později než změny v uspořádání MT. MAP65-1 je ale pravděpodobně citlivější detektor změn MT než jsou MT samotné. Předpoklad vychází ze studie Chang *et al.* (2005). Autoři na základě GFP fúzních proteinů zjistili, že turnover MAP65-1 vázaného k mikrotubulům je čtyřikrát až pětkrát rychlejší než „treadmilling“ mikrotubulů. Nové molekuly GFP-MAP65-1 se po vysvícení laserem na původní vysvícené místo dopraví rychleji, než se tomu děje u MT, a váží se pouze na polymerované mikrotubuly. Nedochází k přesouvání MAP65-1 proteinů podél mikrotubulů, spíš s nimi asociují náhodně.

Vzhledem k předchozímu jsem tedy pozorovala a porovnávala změny v uspořádání jak kortikálních mikrotubulů, tak proteinu MAP65-1. Použity byly navíc dvě metody vizualizace MT, a to imunofluorescence a *in vivo* pozorování v rostlinách exprimujících GFP-tubulin.

Za působení Al^{3+} byla zjištěna reorganizace MT. Svazky MT po 1 minutě působení Al^{3+} byly skutečně tenčí a zároveň četnější oproti MT kontroly. Liší se samozřejmě i vzhled MT. U kontrolní varianty jsou běžné mírně neuspořádané svazky MT, které nejsou zcela rovnoběžné, přestože je obecně zachována jejich transversální organizace. Po působení Al^{3+} jsou MT u *Arabidopsis* jasnější, rovné a pravidelně uspořádané do rovnoběžných svazků. Běžně bylo pozorováno, že imunofluorescenční obrázky jsou u variant s působením Al^{3+} kvalitnější, MT zřetelnější a lépe zachované. Podobný jev byl pozorován i u BY-2 (Schwarzerová *et al.*, 2002).

Působení Al^{3+} se unikátně projevuje u proteinu MAP65-1, u nějž dochází k přechodné (tranzientní) reorganizaci. Popis změn je však spíše problematický, neboť je založen pouze na porovnávání jednotlivých obrázků a změny nebyly hodnoceny žádnou analýzou. Dimery MAP65-1 tvoří 25nm můstky mezi jednotlivými mikrotubuly a spojují je v mohutnější svazky. Vzhledem k této své vlastnosti a k tomu, že asociuje kromě preprofázového prstence, mikrotubuly pozdní anafáze a fragmoplastu také s interfázovými kortikálními mikrotubuly (Smertenko *et al.*, 2004), je MAP65-1 významným kandidátem na zprostředkovatele reakcí mikrotubulů za působení vnějších podmínek. Al^{3+} během 5 minut působení vyvolává změny v signálu GFP-MAP65-1. Zkracují se úseky kolokalizující s MT a v jejich průběhu se tvoří přerušení, asociovaný protein tedy neinteraguje rovnoměrně s celým svazkem MT. Tyto defekty ale po 30 minutách působení Al^{3+} mizí, signál MAP65-1 je méně fragmentován a prodlužuje se oblast MAP65-1 kolokalizující s MT. Samozřejmě se ale vzhled MAP65-1 po 30 minutách působení Al^{3+} liší oproti kontrolnímu stavu bez žádného působení. U kontroly probíhají úseky MAP65-1 kolokalizující s MT napříč celou buňkou, oblast kolokalizace je tedy delší a zároveň silnější. Zajímavý doprovodný jev je ztenčování těchto pruhů oproti původnímu kontrolnímu stavu. Tato jedinečná reakce obnovování kolokalizace MAP65-1 s MT byla pozorována pouze po působení Al^{3+} a částečně po 1 hodině působení gadolinia s následným působením Al^{3+} , další testované varianty ji nezpůsobovaly. Ztenčování jistě souvisí se změnami v uspořádání mikrotubulárních svazků. Ty se za působení Al^{3+} také ztenčují. Je zajímavé, že tato přechodná změna nebyla pozorována v *Arabidopsis* u GFP-MBD (domény vázající se na mikrotubuly, microtubule binding domain, z lidského MAP-4; Sivaguru *et al.*, 2003b). Autoři pozorují pouze postupnou ztrátu signálu GFP-MBD a zvyšující se frekvenci teček na úkor pruhů kolokalizujících s MT v průběhu času (2-30 minut). Tento projev GFP-MBD vysvětlují jako depolymeraci mikrotubulů a vznik oligomerů tubulinu asociovaných s GFP-MBD. Závěr byl ovšem učiněn pouze na

základě pozorování GFP-MBD a jeví se jako problematický ve chvíli, kdy jej začneme porovnávat s pozorováním samotných mikrotubulů a rostlinného MAP65-1.

Pozorování tranzientní reorganizace MAP65-1 odhalilo, že tento původní rostlinný protein se za působení Al^{3+} chová jinak než MBD lidského MAP-4. Dále na základě hodnocení počtů a relativních tloušťek svazků mikrotubulů můžeme tvrdit, že u mikrotubulů během krátkodobého (30 minut) působení Al^{3+} s nejvyšší pravděpodobností nedochází k depolymeraci jednotlivých mikrotubulů v rámci svazku, ale především ke štěpení silnějších svazků na větší počet tenčích svazků. Za jejich ztenčování se totiž zároveň zvyšuje jejich počet se stejnou závislostí, s jakou se vyskytují různé počty různých silných mikrotubulů u kontroly. Vzhledem k těmto výsledkům můžeme prohlásit, že změny v uspořádání MAP65-1 a MT spolu úzce souvisí, ale fragmentace MAP65-1 neznamená, že současně dochází k depolymeraci MT.

Působení glutamátu na MT se liší od působení Al^{3+} . Mikrotubuly na rozdíl od působení Al^{3+} nejsou po působení glutamátu pravidelně rovnoběžně uspořádané, jejich svazky jeví značnou neuspořádanost. Míra neuspořádanosti po působení glutamátu je zároveň vyšší než u kontroly, svazky MT se častěji odklánějí od transverzální orientace, která u kontroly převládá. Taktéž dochází k jejich ztenčování za zvýšení jejich počtů. Je nutné podotknout, že obrázky použité pro hodnocení změn v počtu a síle mikrotubulárních svazků dokumentující změny v uspořádání kortikálních MT po 15 minutách působení glutamátu nebyly vysoké kvality, a tudíž je nutno přistupovat opatrně k jejich interpretaci. Značné zvýšení počtu mikrotubulárních svazků po 15 minutách působení glutamátu, které ukázala analýza, může být částečně dáno zhoršenou kvalitou podkladů a tento výsledek bude třeba dále ověřit.

Po promývání glutamátem ubývá postupně MAP65-1 kolokalizujících s MT po 30 minutách oproti 5 i 0 minutám. Změny v organizaci MAP65-1 po působení glutamátu nejsou rozhodně výraznější než změny po působení Al^{3+} , a nepotvrzují tak glutamátovou hypotézu, jelikož narozdíl od mých výsledků způsoboval glutamát výraznější a časnější změny než Al^{3+} u GFP-MBD exprimujících rostlin (Sivaguru *et al.*, 2003b). I v tomto případě se tedy projevil rozdíl v reakci původně rostlinného MAP65-1 a MBD součásti lidského MAP-4.

Zajímavé bylo zjištění, že i za působení nízkého pH již po 1 minutě dochází rovněž ke ztenčování MT za zvýšení jejich počtu. Po 15 a 30 minutách působení jsou MT v buňce dezorganizované, rovněž tenké a ve zvýšeném počtu na jednotku délky. Způsob dezorganizace se ale liší od dezorganizace způsobené glutamátem i Al^{3+} . Na základě

pozorování imunofluorescenčně značených MT po působení sníženého pH můžeme svazky označit za zprohýbané, nejsou tedy pravidelně rovnoběžně uspořádané jako po působení Al^{3+} . Taktéž se liší od kontroly s převážně transversálně uspořádanými svazky.

Totéž je pozorovatelné i v MAP65-1 exprimujících rostlinách. Za působení sníženého pH jsou oblasti MT, se kterými kolokalizuje MAP65-1, po 30 minutách tenčí a ubývá jich. U některých buněk byla zaznamenána i změna vzhledu, což možná souvisí i s podobně se měnícím vzhledem MT. Podobný krátkodobý vliv sníženého pH nebyl popsán u GFP-MBD. Působení sníženého pH bylo považováno za kontrolní variantu (Sivaguru *et al.*, 2003b). Stejně tak bylo snížené pH považováno za kontrolní variantu při studiích dlouhodobých efektů Al^{3+} na MT (Blancaflor *et al.*, 1998, Sivaguru *et al.*, 2003a) a jeho působení na MT či GFP-MBD nebylo konfrontováno s rostlinami ovlivněnými původním kultivačním médiem.

Přestože reakce MT na působení glutamátu a sníženého pH se v některých aspektech podobá působení Al^{3+} (ztenčování MT za zvýšení jejich počtu, ne však vzhled MT svazků), rostlinný organizmus jako celek na glutamát či nízké pH nereaguje stejně jako na působení Al^{3+} , jak je vidět z analýzy růstu kořenů. Glutamát pouze z poloviny postihuje růst kořene jako Al^{3+} , za působení nízkého pH není růst kořenů takřka ovlivněn, zatímco na působení Al^{3+} rostlina reaguje záhy zastavením růstu kořenů. Po působení Al^{3+} v porovnání s působením samotného nízkého pH nebylo možné popsat ve všech ohledech unikátní chování mikrotubulární sítě. Spíše lze shrnout, že vzhledem k reakci MT ve všech testovaných variantách (Al^{3+} , glutamát, snížené pH) jsou kortikální mikrotubuly očividně jedním z prvních a velmi citlivých cílů mnoha různých působení vnějšího prostředí, a to cílem daleko citlivějším, než se doposud předpokládalo. Z předchozího můžeme vyvodit závěr, že MT mohou díky velmi citlivým reakcím hrát významnou úlohu v signalizaci v rostlinné buňce. Přenášejí tak informaci o působení vnějších podnětů, přičemž další průběh reakce rostlinného organismu závisí na charakteru podnětu. Každý podnět z vnějšího či vnitřního prostředí vyvolává v rostlinné buňce charakteristické změny v hladinách cytosolického Ca^{2+} . Tranzientní zvýšení $[Ca^{2+}]_{cyt}$ může být jednoduché, dvojité nebo vykazovat oscilaci. Místo, doba trvání, periodičita a amplituda $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscilací je velmi variabilní a jejich forma je často závislá na síle a kombinaci stimulů (Evans, 2001). Je tedy možné, že glutamát, snížené pH i Al^{3+} způsobují výkyvy každý na jiném místě v buňce či způsobují zcela jiný průběh výkyvů v hladinách cytosolického Ca^{2+} , a proto je organizace kortikálních MT po jejich působení mírně odlišná a má z dlouhodobého hlediska pro rostlinu zcela jiný význam.

Alternativně k předchozímu se naskýtá vysvětlení, že pozorované změny v uspořádání kortikálních MT jsou vzhledem k jejich vysoké citlivosti na vnější podněty způsobeny kombinací působení příslušného roztoku (Al^{3+} , glutamátu, sníženého pH) a mechanického působení vyvolaného manipulací s rostlinami. Mechanické ovlivnění je možné vyvolat např. ve chvíli, kdy je rostlinka vyjímána z růstového roztoku, položena na sklo komůrky konfokálního mikroskopu a kořen je přikryt krycím sklem. Ačkoliv je tato manipulace vysoce šetrná, je možným zdrojem mechanického signálu pro kořenovou špičku. Usuzujeme tak ze skutečnosti, že bez zablokování signalizace zprostředkované Ca^{2+} kanály gadoliniem se na uspořádání kortikálních MT projevilo působení všech 3 testovaných roztoků (Al^{3+} , glutamát i snížené pH). Mikrotubuly se tedy účastnily signalizace ve všech 3 případech a v současné době je tedy zatěžko rozhodnout, zda a do jaké míry se na změně jejich uspořádání podílí i mechanické podněty při provádění pokusu. Jistě by bylo zajímavé věnovat se této problematice dále a šířeji.

Vliv gadolinia je znatelný na samotných imunofluorescenčně barvených mikrotubulech, při *in vivo* pozorováních GFP-tubulinu i GFP-MAP65-1, cytoskeletální struktury jsou po jeho působení jasnější a zřetelnější. Tento jev jsem pozorovala téměř spolehlivě při každé vizualizaci. Sivaguru *et al.* (2003b) nemluví o žádných podobných změnách u rostlin exprimujících GFP-MBD. Analýza MT po působení gadolinia ale překvapivě neodhalila změny v síle a počtu mikrotubulárních svazků, které se neliší od kontroly.

Vliv gadolinia je však velmi zřetelný ve variantách, kde bylo předem gadoliniem působeno na kořeny, dále ovlivněné Al^{3+} , glutamátem či sníženým pH. V těchto variantách totiž ošetření gadoliniem zabránilo prokazatelně rozpouštění svazků MT. Možné vysvětlení spočívá ve funkci gadolinia jako inhibitoru některých Ca^{2+} kanálů (White, 1998). Pokud je signál k MT přenášen prostřednictvím vzniku tranzientně zvýšených hladin Ca^{2+} , které vedou k následné reakci MT, je zřejmé, že zablokováním některých Ca^{2+} kanálů gadoliniem lze předejít i reakci MT. Jestliže se v buňce pouze v menší míře zvyšuje hladina Ca^{2+} v reakci na jakýkoli signál z vnějšího prostředí, ať už je to dotyk či změny světelných podmínek při manipulaci s rostlinami před samotným pozorováním na mikroskopu, nedochází k výraznému ovlivnění mikrotubulů zvýšenými hladinami a oscilacemi v $[Ca^{2+}]_{cyt}$, případná reorganizace se signální funkcí je pouze těžko postřehnutelná a mikrotubuly i MAP65-1 nepodléhají změnám.

Gadolinium působilo zřejmě odlišně na úrovni MT a MAP65-1. U samotných MT nejsou znatelné žádné změny v uspořádání po působení gadolinia a následném působení

Al^{3+} , glutamátu či pH. Tím se liší reakce MT od reakce MAP65-1. U rostlin vystavených působení gadolinia po dobu minimálně 1 hodiny a následnému působení Al^{3+} nebyla tranzientní reorganizace MAP65-1 tak znatelná jako po působení samotného Al^{3+} , ale po detailnějším pozorování ji bylo možné najít téměř u každého kořene. MAP65-1 reaguje zmenšením úseků kolokalizujících s MT v menší míře, ale stejným způsobem jako po působení samotného Al^{3+} . Navíc se po 30 minutách působení Al^{3+} signál MAP65-1 obnovuje a nabývá kontrolního uspořádání. I tento výsledek však bude třeba dále ověřit, a to především použitím vhodné metody analýzy změn signálu MAP65-1, která však není v současné době k dispozici.

Vzhledem k tomu, že po ošetření gadoliniem a následném působení Al^{3+} dochází k tranzientní reorganizaci sice v menší míře než po samotném působení Al^{3+} , ale dochází k ní, můžeme se domnívat, že Al^{3+} působí prostřednictvím i jiných Ca^{2+} kanálů, nejen kanálů blokových gadoliniem a řízených glutamátem. Hypotéza o působení Al^{3+} prostřednictvím glutamátem řízených kanálů se jeví nedostatečnou i ve stínu dalších poznatků. Fytotoxické gadolinium neblokuje funkci všech vápenatých kanálů, ale má schopnost blokovat pouze 30% všech vápenatých kanálů v rostlinné buňce (White, 1998). Zřejmě tedy nemohu prohlásit stejně jako Sivaguru *et al.* (2003b), že Al^{3+} působí pouze prostřednictvím glutamátem řízených Ca^{2+} kanálů.

Gadolinium a následné působení glutamátu nevyvolává v uspořádání MT ani MAP65-1 žádné změny v souladu s faktem, že Gd blokuje Ca^{2+} kanály řízené glutamátem. Ani u GFP-MBD nepozorovali Sivaguru *et al.* (2003b) po tomto působení žádné změny.

Rovněž nedochází ke změnám v uspořádání MT a MAP65-1 po působení gadolinia a následném působení sníženého pH. Ani u GFP-MBD nebyly pozorovány žádné změny (Sivaguru *et al.*, 2003b). V tomto případě bylo blokování glutamátem řízených Ca^{2+} kanálů účinné a zabránilo reakci MAP65-1.

Na závěr je nutné zmínit se o pozorování změn *in vivo* na GFP-tubulin exprimující linii *Arabidopsis*. Při sledování změn mikrotubulů *in vivo* pomocí GFP-tubulin exprimujících linií *Arabidopsis* nebylo možné zjistit totéž co pomocí imunofluorescenčního značení mikrotubulů. Nebylo možné spolehlivě potvrdit pouhé ztenčování MT za zvyšování jejich počtu za působení Al^{3+} ani stejné změny v jejich uspořádání za působení dalších faktorů. Rostliny exprimující GFP-tubulin se nepodařilo téměř nikdy nasnímat třikrát za sebou, aniž by nedošlo k obrovské ztrátě signálu. Nebylo tedy možno získat kvalitní obrázky. Proto byla všechna měření a hodnocení počtů a relativních tloušťek prováděna na imunofluorescenčních obrázcích. Možné vysvětlení

této skutečnosti je, že u GFP-tubulinu po reorganizaci, totiž rozpuštění svazků MT následkem různých působení, jsou jemné mikrotubulární svazky již pod detekčním limitem konfokálního mikroskopu, neboť na svazek MT připadá menší množství fluoreskujících molekul. Rozpadání mikrotubulů do tenčích svazků, jaké je vidět při imunofluorescenčním značení, se tedy při pozorování GFP-tubulinu jeví jako depolymerace (ztrácení signálu) a jako depolymerace bylo také doposud interpretováno. Nicméně je zřetelné, že každý z těchto dvou metodických přístupů ke zkoumané problematice (imunofluorescenční značení MT a pozorování *in vivo* GFP-exprimujícího rostlinného materiálu) poskytuje odlišný výsledek, a tudíž odlišné vysvětlení jevů probíhajících v rostlinné buňce.

5.3 Shrnutí

Metodické postupy:

1. Byla zavedena nová kultivační hydroponická metoda pro rostliny *Arabidopsis thaliana*
2. Byla zavedena metoda detekce cytoskeletu v kořenech *Arabidopsis* pomocí nepřímé imunofluorescence.

Zastavení růstu kořenů:

1. Al^{3+} indukuje zastavení růstu kořenů. Tento účinek nelze zvrátit dodáním Ca^{2+} ani stabilizací či destabilizací MT.
2. Glutamát působí odlišným mechanismem od Al^{3+} , neboť růst kořenů omezuje, nikoliv úplně zastavuje.

Změny v cytoskeletu po působení Al^{3+} :

1. **Al^{3+} indukuje specifické změny v kortikálním cytoskeletu.** Imunofluorescenčně značené MT jsou velmi přesně rovnoběžně organizované narozdíl od všech ostatních testovaných variant. Al^{3+} má tedy specifický vliv na organizaci MT.
2. **Glutamátová teorie nepotvrzena.** Nebylo prokázáno, že signalizace Al^{3+} působení zahrnuje výhradně glutamátém řízené Ca^{2+} kanály, neboť projevy po aplikaci Al^{3+} a glutamátu se lišily jak v pokusech s růstovou analýzou, tak v reakci kortikálních MT.
3. **MT jako senzorická struktura.** Analýza relativních tloušťek MT a jejich počtů ve stanovené délce buňky však ukazuje, že MT se ztenčují již po

1 minutě po jakémkoliv působení, ovšem ne po předchozím působení gadolinia. Změny v uspořádání MT bylo možno pozorovat pomocí imunolokalizace i v *in vivo* pokusech (kde ovšem MT nebyly hodnoceny analýzou). Jako nejpravděpodobnější se jeví vysvětlení, že MT jsou více citlivé na jakékoliv podněty z okolí, než jsme si dosud představovali. Ztenčování MT ve všech variantách tedy naznačuje, že jak chemické podněty (Al^{3+} , glutamát, pH), tak mechanické (přenesení rostlinky na sklo a přiklopení kořene krycím sklem) jsou možnými spouštěči reorganizace MT. Vzhledem k vysoké citlivosti je tedy velmi pravděpodobné, že MT mohou být součástí signálních kaskád, přenášejících podněty z vnějšího prostředí do kořene.

4. **Nejde o prostou depolymeraci.** Pomocí analýzy bylo dále prokázáno, že změny, konkrétně zdánlivá „depolymerace“ MT, nemusí být jednoduchý proces. Během reakce na výše zmíněné podněty se spíše rozpouštějí svazky kortikálních MT (zvyšuje se počet MT vztážený na délku a zároveň se MT ztenčují). Tento proces samozřejmě může a nemusí být doprovázen i částečnou depolymerací, způsobenou např. menší stabilitou užších svazků MT a/nebo absencí stabilizujících MAPs. Popis procesu ztenčování svazků MT jako reakce na podnět nebyl ještě publikován.
5. **Nutné je používat různé metody detekce.** Citlivost MT k vnějším podnětům se zřejmě odrazila i v neúspěšném pozorování kortikálních MT v rostlinách exprimujících GFP-tubulin. Stejně jako u imunofluorescenčně značených MT bylo možno pozorovat během ovlivnění slábnutí signálu ve všech variantách kromě těch, kde bylo na rostliny předem působeno gadoliniem. Bohužel signál byl často natolik slabý, že MT nebylo možno hodnotit analýzou stejně jako imunofluorescenčně značené MT. Důvody jsou zřejmě následující. Značení MT pomocí GFP-tubulinu není do stejné míry citlivé jako imunofluorescenční značení. Při něm totiž dochází k „obalení“ MT svazků protilátkami, zatímco v transgenních rostlinách se vyskytuje ve svazku MT vždy jen několik fluoreskujících molekul. V důsledku toho jsou svazky, pokud se ztenčí na určitou mezní hranici a svazek obsahuje jen málo fluoreskujících molekul, pod detekčním limitem konfokálního mikroskopu. Na druhou stranu i zde bylo možno pozorovat stabilizující efekt gadolinia.

6. **Ca²⁺ ionty jsou zapojené v signálních kaskádách, jichž se účastní MT.**
Analýzy relativní tloušťky prokázaly, že k rozpadání svazků MT nedochází, pokud je na kořeny předem působeno gadoliniem, specifickým blokátorem některých Ca²⁺ kanálů. Je tedy dokonce možné určit další člen signální kaskády, totiž Ca²⁺, jejichž tranzientní zvýšená koncentrace v cytosolu zřejmě hraje roli v přenosu signálu stejnou signální dráhou, ve které fungují i MT. Paradoxně tedy nebylo možno určit, zda tato dráha platí pouze pro Al³⁺, avšak mé výsledky naznačují, že se může uplatňovat obecně v celé řadě dalších podnětů chemických i mechanických. Toto bude třeba ještě prozkoumat pomocí analýzy MT u rostlin, kde budou skutečně vyloučeny všechny možné podněty včetně podnětu mechanického.
7. **MAP65-1 jako možný zprostředkovatel přenosu signálu.** MAP65-1 se zřejmě účastní reakce MT na působení Al³⁺, ne však na ostatní zkoumané podněty (snížené pH a glutamát), protože dochází k jeho dočasnému odloučení od MT. Tato reakce však není zřejmě regulována gadoliniem blokovanými Ca²⁺ kanály, neboť nastává i po jejich zablokování gadoliniem.

6 Abstract

In spite of the wide interest concerning the topic of aluminium toxicity in plants, there wasn't postulated any unambiguous conclusion, how is the aluminium signal transferred to the cell. It is well known, the root growth is immediately inhibited by Al^{3+} . The results of the diploma thesis showed, the root growth is inhibited in spite of the presence of Ca^{2+} which was referred as a cation with ameliorative effects on the root growth in the conditions of Al-toxicity. After stabilizing microtubules with taxol or destabilizing with oryzalin, the root growth inhibition caused by Al^{3+} remained unaffected.

Cortical microtubules are considered to be one of the first aims of aluminium toxicity. Their early response to the presence of Al^{3+} indicate the putative role of microtubule (MT) reorientation in aluminium signal transduction. Changes in the organization of cortical microtubule arrays were visible after 1min of aluminium treatment. The arrays show strictly parallel organization, which is a unique reorientation observed only after aluminium treatment. However, the number and thickness of MT arrays changed significantly after each tested treatment (Al^{3+} , glutamate, low pH). Therefore, it's very tempting to declare cortical MTs a very sensitive structure which is involved in all cellular signalling. So far, we are not able to distinguish the effect of mechanical stimuli caused within the procedure and the effect of treatment (Al^{3+} , glutamate, low pH) on it's own. The analysis of number and thickness of MTs showed that after each treatment, there probably wasn't caused any depolymerization of cortical MTs, the MTs only loose their arrays, so that they become thinner while they are increasing in number.

The reorganization of MTs is prevented by gadolinium-inhibition of the part of Ca^{2+} channels. Therefore, the Ca^{2+} is one of the members of signalling pathways probably caused by Al^{3+} , glutamate and low pH.

MAP65-1 (microtubule-associated protein) is somehow involved in the reaction of cortical MTs on external Al^{3+} . In roots of GFP-MAP65-1 expressing line of *Arabidopsis thaliana*, there is a strong evidence of MAP65-1 reorganization after 5min 100 μM AlCl_3 treatment. Nevertheless, the reorganization is transient, after 30min treatment the recovery is visible, MAP65-1 is bound to microtubules again. This transient reorganization of MAP65-1 isn't blocked by gadolinium in general. In contrast, such transient reorganization wasn't observed after the treatment with glutamate or low pH. We can conclude, that MAP65-1 shows a unique reaction on Al^{3+} treatment and may play an important role in Al signal transduction.

7 Přílohy

Ad Graf 4.1

Vliv hliníku na růst kořenů		
varianta	průměrná délka kořene [mm]	směrodatná odchylka [mm]
AlpHCasach12hod	1,56	0,38
AlpHCasach24hod	1,53	0,31
AlpHCasach6hod	1,76	0,30
AlpHsach12hod	2,12	0,31
AlpHsach24hod	2,05	0,33
AlpHsach6hod	1,72	0,33
kontrola0hod	1,92	0,31
kontrola12hod	4,97	0,32
kontrola24hod	5,63	0,34
kontrola6hod	3,15	0,35
pHCasach12hod	2,27	0,33
pHCasach24hod	3,13	0,32
pHCasach6hod	2,76	0,31
pHsach12hod	3,93	0,32
pHsach24hod	4,40	0,36
pHsach6hod	2,84	0,34

Tab. 7.1 Průměrné délky kořenů se směrodatnými odchylkami po 6, 12 a 24 hodinách působení Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH.

Ad Graf 4.3

Vliv hliníku na růst kořenů		
varianta	průměrná délka kořene [mm]	směrodatná odchylka [mm]
AlpHsach4d	5,59	1,04
AlpHCasach4d	5,82	1,03
pHCasach4d	35,17	1,02
pHsach4d	39,14	1,04
kontrola4d	30,94	1,17
kontrola0d	5,05	0,89

Tab. 7.2 Průměrné délky kořenů se směrodatnými odchylkami po 4 dnech působení Al^{3+} , Ca^{2+} a sníženého pH.

Ad Graf 4.5

Vliv hliníku a taxolu na růst kořenů		
varianta	průměrná délka kořene [mm]	směrodatná odchylka [mm]
Al4d	5,59	0,53
Altaxol4d	4,13	0,40
Glu4d	13,33	0,47
K4d	21,62	0,50
Kt0	3,71	0,44
taxol4d	25,95	0,48

Tab. 7.3 Průměrné délky kořenů se směrodatnými odchylkami po 4 dnech působení Al^{3+} , glutamátu, taxolu a současného působení Al^{3+} s taxolem.

Ad Graf 4.7

Vliv hliníku, taxolu a hliníku s předchozím působením taxolu na růst kořenů		
varianta	průměrná délka kořene [mm]	směrodatná odchylka [mm]
Al0d	3,75	0,24
Al1d	4,37	0,24
Al2d	4,61	0,25
Al_taxol0d	5,10	0,29
Al_taxol1d	6,37	0,28
Al_taxol2d	6,23	0,28
K0d	5,07	0,29
K1d	9,86	0,27
K2d	15,97	0,30
taxol0d	4,49	0,30
taxol1d	8,69	0,30
taxol2d	13,76	0,33

Tab. 7.4 Průměrné délky kořenů se směrodatnými odchylkami po 1 a 2 dnech působení Al^{3+} , taxolu a Al^{3+} s předchozím působením taxolu.

Ad Graf 4.9

Vliv hliníku, oryzalinu a hliníku s předchozím působením oryzalinu na růst kořenů		
varianta	průměrná délka kořene [mm]	směrodatná odchylka [mm]
Al0d	6,69	0,19
Al1d	7,21	0,18
Al2d	6,80	0,18
K0d	7,04	0,21
K1d	15,97	0,21
K2d	21,90	0,21
ory200nM0d	6,82	0,23
ory200nM1d	10,59	0,21
ory200nM2d	10,48	0,20
ory200nM_Al0d	6,31	0,23
ory200nM_Al1d	6,46	0,23
ory200nM_Al2d	6,27	0,23
ory550nM0d	5,98	0,22
ory550nM1d	8,43	0,23
ory550nM2d	8,63	0,24
ory550nM_Al0d	6,12	0,22
ory550nM_Al1d	6,87	0,22
ory550nM_Al2d	6,87	0,23

Tab. 7.5 Průměrné délky kořenů se směrodatnými odchylkami po 1 a 2 dnech působení Al^{3+} , oryzalinu a Al^{3+} s předchozím působením oryzalinu.

Ad Graf 4.11

varianta	průměrný počet svazků MT na 15 μ m	směrodatná odchylka
K	52,58	9,50
AI1	69,78	5,83
AI15	65,71	4,97
AI30	66,86	3,64
Glu1	74,79	3,36
Glu15	76,27	6,51
Glu30	66,23	7,36
pH1	75,52	4,12
pH15	72,83	4,32
pH30	70,60	3,50
KGd	50,17	8,60
GdAI1	45,09	12,95
GdAI15	51,39	5,17
GdAI30	48,64	7,08
GdGlu1	45,92	15,42
GdGlu15	53,33	7,50
GdGlu30	52,64	6,96
GdpH1	39,67	8,12
GdpH15	38,09	4,06
GdpH30	47,42	10,42

Tab. 7.6 Průměrný počet mikrotubulárních svazků na 15 μ m v jednotlivých hodnocených variantách.

8 Seznam literatury

Abdrakhamanova, A., Wang, Q.Y., Khokhlova, L., Nick P. (2003): Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.* 44 (7): 676-686

Ahn, S.J., Siavaguru, M., Osawa, H., Chung, G.Ch., Matsumoto, H. (2001): Aluminum inhibits the H-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126: 1381–1390

Ahn, S.J., Sivaguru, M., Chung, G.C., Rengel, Z., Matsumoto, H. (2002): Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *Journal of Experimental Botany* 53 (376): 1959-1966

Andersson, M.E. (1993): Aluminium toxicity as a factor limiting the distribution of *Allium ursinum* (L.). *Annals of Botany* 72: 607-611

Andersson, M.E., Brunet, J. (1993): Sensitivity to H and Al ions limiting growth and distribution of the woodland grass *Bromus benekenii*. *Plant and Soil* 153: 243-254

Asada, T., Kuriyama, R., Shibaoka, H. (1997): TKRP125, a kinesin-related protein involved in the centrosome-independent organization of the cytokinetic apparatus in tobacco BY-2 cells. *Journal of Cell Science* 110: 179-189

Barroso, C., Chan, J., Allan, V., Doonan, J., Hussey, P., Lloyd, C. (2000): Two kinesin-related proteins associated with the cold-stable cytoskeleton of carrot cells: characterization of a novel kinesin, DcKRP120-2. *The Plant Journal* 24(6): 859-868

Baskin, T., Wilson, J.E., Cork, A., Williamson, R.E. (1994): Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol.* 33 (6): 935-942

- Basu, U., Good, A.G., Taylor, G.J. (2001): Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant, Cell & Environment* 24: 1269-1278
- Bhuja, P., McLachlan, K., Stephens, J., Taylor, G. (2004): Accumulation of 1,3- β -D-glucans, in response to aluminum and cytosolic calcium in *Triticum aestivum*. *Plant Cell Physiol.* 45 (5): 543–549
- Blancaflor, E.B., Jones, D.L., Gilroy, S. (1998): Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* 118: 159–172
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. (2003): Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62: 181–189
- Breviario, D., Nick, P. (2000): Plant tubulins: a melting pot for basic questions and promising applications. *Transgenic Research* 9: 383-393
- Budíková, S. (2001): Responses of rhizodermal maize cells to AlCl₃. Book of Abstracts-IXth Days of Plant Physiology, České Budějovice 17.-21.9. 2001: 146
- Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H., Ye, Z.H. (2001): A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *The Plant Cell* 13: 807–827
- Burk, D.H., Ye, Z.H. (2002): Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *The Plant Cell* 14: 2145–2160
- Bush, D.S. (1993): Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* 103: 7-13
- Buschmann, H., Fabri, C.O., Hauptmann, M., Hutzler, P., Laux, T., Lloyd, C.W., Schäffner, A.R. (2004): Helical growth of the *Arabidopsis* mutant *tortifolia1* reveals a plant-specific microtubule-associated protein. *Current Biology* 14: 1515–1521

Clarkson, D.T. (1965): The effect of aluminium and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Ann. Bot. N S* 29:309-315

Cleary, A.L., Smith, L.G. (1998): The tangled1 gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *The Plant Cell* 10: 1875–1888

Clune, T.S., Copeland, L. (1999): Effects of aluminium on canola roots. *Plant and Soil* 216:27-33

Čiamporová, M., Ouzounidou, G., Banášová, V. (1995): Effects of soil acidity and accompanying ion stresses on structure of nodal roots of the tolerant species *Nardus stricta* L. and *Deschampsia flexuosa* L. *Biologia* 50: 99-104

Čiamporová, M., Mistrík, I. (2001): Effects of aluminium on structure and functions of plant roots. *Book of Abstracts- IXth Days of Plant Physiology, České Budějovice 17.-21.9. 2001*: 147

Čiamporová, M. (2002): Morphological and structural responses of plant roots to aluminium toxicity at organ, tissue and cellular levels. *Biologia Plantarum* 45: 161-171

Čížková, R. (1995): Phytohormonal levels in spruce roots under aluminium stress. F. Baluška *et al.* (Eds.), *Structure and function of roots*, Kluwer Academic Publishers: 335-339

Delhaize, E., Ryan, P.R. (1995): Aluminium toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107: 315-321

Dhonukshe, P., Gadella, T.W.J. Jr.(2003): Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein–CLIP170 microtubule plus-end labeling. *The Plant Cell* 15: 597–611

Dhonukshe, P., Laxalt, A.M., Goedhart, J., Gadella, T.W.J., Munnik, T. (2003): Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *The Plant Cell* 15: 2666–2679

Dixit, R., Cyr, R. (2004): The cortical microtubule array: From dynamics to organization. *The Plant Cell* 16: 2546-2552

Durso, N.A., Cyr, R.J. (1994): A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 α . *The Plant Cell* 6: 893-905

Eliášová, K. (2000): Vliv chladu a iontů hliníku na dělení buněk kořenové špičky pšenice (*Triticum aestivum* L.). Dizertační práce. Praha

Etherton, B., Heppner, T.J., Cumming, J.R., Nelson, M.T. (2004): Opposing effects of aluminum on inward-rectifier potassium currents in bean root-tip protoplasts. *The Journal of Membrane Biology* 198 (1): 15-22

Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M. (2001): Calcium oscillations in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4:415–420

Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, M. (2000): Expression of aluminium-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminium stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122: 657-665

Ezaki, B., Sasaki, K., Matsumoto, H., Nakashima, S. (2005): Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene. *Journal of Experimental Botany* 56 (420): 2661-71

Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. (2000): Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. I. Mitotic cells. *New Phytol.* 145 (2): 211

Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. (2005): Aluminium causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cells of *Triticum turgidum*. *Protoplasma* 225: 129–140

Furrer, G. (1993): New aspect on the chemistry of aluminium in soils. *Aquatic Sciences* 55/4: 281-290

Gardiner, J.C., Harper, J.D.I., Weerakoon, N.D., Collings, D.A., Ritchie, S., Gilroy, S., Cyr, R.J., Marc, J. (2001): A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *The Plant Cell* 13: 2143-2158

Gardiner, J., Marc, J. (2003): Putative microtubule-associated proteins from the *Arabidopsis* genome. *Protoplasma* 222: 61-74

Goddard, R.H., Wick, S.M., Silflow, C.D., Snustad, P.D. (1994): Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiol.* 104: 1-6

Grabski, S., Schindler, M. (1995): Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol.* 108: 897-901

Hamada, T., Igarashi, H., Itoh, T.J., Shimmen, T., Sonobe, S. (2004): Characterization of a 200 kDa microtubule-associated protein of tobacco BY-2 cells, a member of the XMAP215/MOR1 family. *Plant Cell Physiol.* 45 (9): 1233-1242

Heim, A., Luster, J., Brunner, I., Frey, B., Frossard, E. (1999): Effects of aluminium treatment on norway spruce roots : aluminium binding forms, element distribution and release of organic substances. *Plant and Soil* 216: 103-116

Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S., Beachy, R.N. (1995): Interaction of tobamovirus movement protein with the plant cytoskeleton. *Science* 270 (5244): 1983-1985

Himmelspach, R., Williamson, R.E., Wasteneys, G.O. (2003): Cellulose microfibril alignment recovers from DCB-induced disruption despite microtubule disorganisation. *The Plant Journal* 36: 565-575

Hlídková, R. (1997): Vliv nízkého pH a Al na kořenový systém pšenice (*Triticum aestivum* L.) cv. Sparta. Diplomová práce. Praha

Hlídková, R., Votrubová, O., Cvikrová, M., Hrubcová, M., Soukupová L. (2001): The effect of low pH and Al on growth, peroxidase activity, content of lignin and phenolic acids in wheat roots. Book of Abstracts- IXth Days of Plant Physiology, České Budějovice 17.-21.9. 2001: 148

Horst, W.J., Schmohl, N., Kollmeier, M., Baluška, F., Sivaguru, M. (1999): Does aluminium affect rot growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum? *Plant and Soil* 215: 163-174

Huang, P.M. (1988): Ionic factors affecting aluminium transformation and the impact on soil and environmental sciences. *Advances in Soil Sciences* 8: 1-78

Huang, J.W., Shaff, J.E., Grunes, D.L., Kochian, L.V. (1992): Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.* 98: 230-237

Huang, J.W., Grunes, D.L., Kochian, L.V. (1993): Aluminum effects on calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) translocation in aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Differential responses of the root apex versus mature root regions. *Plant Physiol.* 102: 85-93

Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., Smertenko, A. (2002): The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Molecular Biology* 50: 915–924

Chan, J., Jensen, C.G., Jensen, L.C.W., Bush, M., Lloyd, C.W. (1999): The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *PNAS* 96 (26): 14931–14936

- Chan, J., Calder, G.M., Doonan, J.H., Lloyd C.W. (2003): EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol.* 5 (11): 967-971
- Chan, J., Calder, G., Fox, S., Lloyd, C. (2005): Localization of the microtubule end binding protein EB1 reveals alternative pathways of spindle development in *Arabidopsis* suspension cells. *The Plant Cell* 17: 1737–1748
- Chang, H.Y., Smertenko, A., Igarashi, H., Dixon, D.P., Hussey, P.J. (2005): Dynamic interaction of NtMAP65-1a with microtubules in vivo. *Journal of Cell Science* 118: 3195-3201
- Chen, L.S., Qi, Y.P., Smith, B.R., Liu X.H. (2005): Aluminum-induced decrease in CO₂ assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO₂ assimilation. *Tree Physiol.* 25 (3): 317-324
- Cho, M.H., Spalding, E.P. (1996): An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8134-8138
- Jiang, Ch.J., Sonobe S. (1993): Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *Journal of Cell Science* 105: 891-901
- Jiang, W., Jimenez, G., Wells,, N.J., Hope, T., Wahl., G.M., Hunter, T., Fukunaga, R. (1998): PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Molecular Cell* 2: 877-885
- Jones, D.L., Kochian, L.V. (1995): Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *The Plant Cell* 7: 1913-1922
- Jones, D.L., Kochian, L.V. (1997): Aluminium interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Letters* 400: 51-57

Jones, D.L., Kochian, L.V., Gilroy, S. (1998): Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* 116: 81–89

Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. (2006): Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment* 29: 1309

Jorge, R.A., Menossi, M., Arruda, P. (2001): Probing the role of calmodulin in Al toxicity in maize. *Phytochemistry* 58: 415–422

Kawamura, E., Himmelspach, R., Rashbrooke, M.C., Whittington, A.T., Gale, K.R., Collings, D.A., Wasteneys, G.O. (2006): MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiol.* 140 (1): 102-114.

Kidd, P.S., Proctor, J. (2000): Effects of aluminium on the growth and mineral composition of *Betula pendula* root. *Journal of Experimental Botany* 51: 1057-1066

Kinraide, T.B., Parker, D.R. (1987): Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. *Plant Physiol.* 83: 546-551

Kinraide, T.B., Parker, D.R. (1989): Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. *Plant, Cell and Environment* 12: 479-487

Kinraide, T.B., Ryan, P.R., Kochian, L.V. (1992): Interactive effects of Al^{3+} , H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant physiol.* 99: 1461-1468

Kollmeier, M., Felle, H.H., Horst, W.J. (2000): Genotypical differences in aluminium resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminium? *Plant Physiol.* 122: 945-956

Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C.S., Horst, W.J., Hedrich, R. (2001): Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiol.* 126: 397–410

Koyama, H., Toda, T., Kojima, Hara, T. (1995): Direct observation of root-elongation of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in hydroponic culture. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41 (1): 173-176

Koyama, H., Toda, T., Hara, T. (2001): Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root of *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. *Journal of Experimental Botany*, 52 (355): 361-368

Landino, L.M., Macdonald, T.L. (1997): Inhibition of the GDP/GTP exchange reaction of *ras p21* by aluminum ion. *Journal of Inorganic Biochemistry* 66:99-102

Lazof, D.B., Goldsmith, J.G., Rufty, T.W., Linton, R.W. (1994): Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol.* 106: 1107-1114

Lee, Y.R.J., Liu, B. (2000): Identification of a phragmoplast-associated kinesin-related protein in higher plants. *Current Biology* 10: 797–800

Li, X.F., Ma, J.F., Matsumoto, H. (2000): Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol.* 123: 1537–1543

Lidon, F.C., Ramalho, J.C., Barreiro, M.G. (1998): Aluminium toxicity modulates nitrate to ammonia reduction. *Photosynthetica* 35 (2): 213-222

Ligaba, A., Shen, H., Shibata, K., Yamamoto, Y., Tonakamasu, S., Matsumoto, H. (2004): The role of phosphorus in Al-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). *Physiol. Plantarum* 120: 575

- Lima, M.L. de, Copeland, L. (1994): Changes in the ultrastructure of the root tip of wheat following exposure to aluminium. *Plant Physiol.* 21: 85-94
- Lindberg, S., Strid, H. (1997): Al induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in root protoplasts of wheat. *Physiologia plantarum* 99: 405-414
- Liu, K., Luan, S. (2001): Internal aluminum block of plant inward K channels. *The Plant Cell* 13: 1453–1465
- Llugany, M., Poschenrieder, Ch., Barceló, J. (1995): Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiologia Plantarum* 93: 265-271
- Ma, J.F. (2000): Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41 (4): 383–390
- Ma, J.F., Hiradate, S. (2000): Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* 211: 355-360
- Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E. (2004): Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant Cell Physiol.* 45(5): 583–589
- Macdonald, T.L., Humphreys, W.G., Martin, R.B. (1987): Promotion of tubulin assembly by aluminum ion in vitro. *Science* 236 (4798): 183-186
- Macdonald, T.L., Martin, R.B. (1988): Aluminium ion in biological systems. *TIBS* 13:15-19
- Macêdo, C.E.C. de, Kinet, J.M., Lutts, S. (2001): Aluminium effects on citric and malic acid excretion in roots and calli of rice cultivars. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13 (1): 13-23

Malkanthi, D.R.R., Yokoyama, K., Yoshida, T., Moritsugu, M., Matsushita, K. (1995): Effect of low pH and Al on growth and nutrient uptake of several plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41 (1): 161-165

Mao, T., Jin, L., Li, H., Liu, B., Yuan, M. (2005): Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol.* 138: 654-662

Massot, N., Llugany, M., Poschenrieder, Ch., Barceló, J. (1999): Callose production as indicator of aluminium toxicity in bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 22: 1-10

Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S. Takahashi, E. (1976): Localization of aluminium in tea leaves. *Plant and Cell Physiology* 17 (3): 627-631

Matsumoto, H. (2000): Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology* 200: 1-46

Matsumoto, H. (2002): Plant roots under aluminium stress: toxicity and tolerance. *In: Plant roots, the Hidden Half*, eds: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkaki, U. Marcel Dekker AG, Basel 2002, 821-838

McClinton, R.S., Chandler, J.S., Callis, J. (2001): cDNA isolation, characterization, and protein intracellular localization of a katanin-like p60 subunit from *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 216 (3-4): 181-190

Meriga, B., Reddy, B.K., Rao, K.R., Reddy, L.A., Kishor, P.B. (2004): Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal Plant Physiol.* 161 (1): 63-68

Miller, J.L., Hubbard, C.M., Litman, B.J., Macdonald, T.L. (1989): Inhibition of transducin activation and guanosine triphosphatase activity by aluminum ion. *The Journal of Biological Chemistry* 264 (1): 243-250

Miyasaka, S.C., Kochian, L.V., Schaff, J.E., Foy, Ch.D. (1989): Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺, and H⁺ transport and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* 91: 1188-1196

Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K., Foy, Ch.D. (1991): Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96: 737-743

Moore, R.C., Cyr, R.J. (2000): Association between elongation factor-1alpha and microtubules *in vivo* is domain dependent and conditional. *Cell Motil Cytoskeleton* 45 (4): 279-292

Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., Hasebe, M. (2005): Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nature Cell Biology* 7 (10): 961-968

Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P.J., Hauser, M.T. (2004): The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Current Biology* 14: 412–417

Müller, S., Han, S., Smith, L.G. (2006): Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol.* 16 (9): 888-894

Nakajima, K., Furutani, I., Tachimoto, H., Matsubara, H., Hashimoto, T. (2004): SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding *Arabidopsis* cells. *The Plant Cell* 16: 1178–1190

Nick, P. (2000): *Plant microtubules. Potential for biotechnology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000

Oppenheimer, D.G., Pollock, M.A., Vacik, J., Szymanski, D.B., Ericson, B., Feldmann, K., Marks, M.D. (1997): Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6261-6266

Pavlovkin, J., Mistrík, I. (2001): Effect of aluminum on membrane potential of maize roots. Book of Abstracts- IXth Days of Plant Physiology, České Budějovice 17.-21.9. 2001: 154

Pellman, D., Bagget, M., Tu, H., Fink, G.R. (1995): Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Cell Biology 130 (6): 1373-1385

Piñeros, M.A., Kochian, L.V. (2001): A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. Plant Physiol. 125: 292–305

Postma, J.W., Keltiens, W.G., Van Riemsdijk, W.H. (2005): Calcium-(organo)aluminum-proton competition for adsorption to tomato root cell walls: experimental data and exchange model calculations. Environ Sci Technol. 39 (14): 5247-5254.

Preuss, U., Doring, F., Illenberger, S., Mandelkow, E.M. (1995): Cell cycle-dependent phosphorylation and microtubule binding of tau protein stably transfected into chinese hamster ovary cells. Molecular Biology of the Cell 6: 1397-1410

Preuss, M.L., Kovar, D.R., Lee, Y.R.J., Staiger, C.J., Delmer, D.P., Liu, B. (2004): A plant-specific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers. Plant Physiol. 136: 3945–3955

Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. (1998): Fyziologie rostlin. Academia Praha

Raimanová, I. (2001): Vliv nízkého pH a hliníku na vybrané druhy mokřadních rostlin. Diplomová práce, Praha

Reddy, A.S.N. (2001): Calcium: Silver bullet in signaling.

Reddy, A.S.N., Day, I.S. (2001): Kinesins in the *Arabidopsis* genome: a comparative analysis among eukaryotes. BMC Genomics 2 (2): 1471-2164

Rengel, Z. (1990): Competitive Al^{3+} inhibition of net Mg^{2+} uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. II. Plant age effects. *Plant Physiol.* 93: 1261-1267

Rengel, Z., Zhang, W.H. (2003): Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytol.* 159: 295

Richardson, D.N., Simmons, M.P., Reddy, A.S.N. (2006): Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomics* 7 (18): 1471-2164

Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P. (2001): Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie* 21: 3-21

Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G., Estelle, M. (1997): Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *The Plant Cell* 9: 745-757

Ryan, P.R., Ditomaso, J.M., Kochian, L.V. (1993): Aluminium toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany* 44(2): 437-446

Ryan, P.R., Reid, R.J., Smith, F.A. (1997): Direct evaluation of the Ca^{2+} -displacement hypothesis for Al toxicity. *Plant Physiol.* 113: 1351-1357

Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J. (1999): Communicating with calcium. *The Plant Cell* 11: 691-706

Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002): Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*: S401–S417

Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W., Fisher, S.E., Scheible, W.R., Somerville, C. R. (2004): The *Arabidopsis* SKU6/SPIRAL1 gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *The Plant Cell* 16: 1506–1520

Sharma, P., Dubey, R.S. (2005): Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *Journal Plant Physiol.* 162 (8): 854-864

Schmohl, N., Horst, W.J. (2000): Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant, Cell and Environment* 23: 735–742

Schwarzerová, K., Zelenková, S., Nick, P., Opatrný, Z. (2002): Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant Cell Physiol.* 43(2):207-216.

Siegel, N., Haug, A. (1983): Aluminium interaction with calmodulin. Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochim. Biophys. A.* 744: 36-45

Silva, I.R., Smyth, T.J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S., Rufty, T.W. (2000): Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol.* 123: 543–552

Silva, I.R., Smyth T.J., Raper C.D., Carter T.E., Rufty T.W. (2001): Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Plant Physiol.* 112 (2): 200-210

Sivaguru, M., Baluška, F., Volkmann, D., Felle, H.H., Horst, W.J. (1999a): Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119(3):1073-1082

Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. (1999b): Differential impacts of aluminium on microtubule organization depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. *Physiologia Plantarum* 107: 110-119

Sivaguru, M., Fujiwara, T., Šamaj, J., Baluška, F., Yang, Z., Osawa, H., Maeda, T., Mori, T., Volkmann, D., Matsumoto, H. (2000): Aluminium-induced 1→3-β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminium toxicity in plants. *Plant Physiol.* 124: 991-1006

Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.H., Tong, H., Osawa, H., Baluška, F., Volkmann, D., Matsumoto, H. (2003a): Aluminium-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 2256-2266

Sivaguru, M., Pike, S., Gassman, W., Baskin, T.I. (2003b): Aluminium rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiol.* 44(7): 667-675

Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Rengel, Z., Ahn, S.J., Matsumoto, H. (2005): Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytol.* 165(1): 99-109

Smertenko, A., Blume, Y., Viklický, V., Opatrný, Z., Dráber, P. (1997): Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta* 201: 349-358

Smertenko, A., Saleh, N., Igarashi, H., Mori, H., Hauser-Hahn, I., Jiang, Ch.J., Sonobe, S., Lloyd, C.W., Hussey, P.J. (2000): A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nature Cell Biology* 2: 750-753

Smertenko, A., Chang, H.Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M.T., Hussey, P.J. (2004): The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *The Plant Cell* 16: 2035-2047

Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S., Levy, J. (2001): TANGLED1: a microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *The Journal of Cell Biology* 152 (1): 231-236

Snowden, K.C., Gardner, R.C. (1993): Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 103: 855-861

Sugimoto, K., Williamson, R.E., Wasteneys, G.O. (2000): New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1493–1506

Tabuchi, A., Kikui, S., Matsumoto, H. (2004): Differential effects of aluminium on osmotic potential and sugar accumulation in the root cells of Al-resistant and Al-sensitive wheat. *Physiologia Plantarum* 120:106

Tesfaye, M., Temple, S.J., Allan, D.L., Vance, C.P., Samac, D.A. (2001): Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol.* 127: 1836–1844

Thion, L., Mazars, Ch., Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Moreau, M., Ranjeva, R. (1996): Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. *FEBS Letters* 393: 13-18

Tice, K.R., David R. Parker, D.R., DeMason, D.A. (1992): Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100: 309-318

Ueda, K., Matsuyama, T., Hashimoto, T. (1999): Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*: rapid communication. *Protoplasma* 206: 201-206

Van, H.L., Kuraishi, S., Sakurai, N. (1994): Aluminium-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. *Plant Physiol.* 106: 971-976

Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze', D., Geelen, D. (2004): In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* 136: 3956–3967

- Vanstraelen, M., Inze, D., Geelen, D. (2006): Mitosis-specific kinesins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 11 (4): 167-175
- Votrubová, O., Černohorská, J., Hlídková, R., Krobová, J., Eliášová, K. (1997): The effect of aluminium on growth and structure of wheat root. *J. Appl. Genet.* 38B:277-281
- Wang, X, Wang, C.Y., Zheng, L., Qin, C.(2000): Determining functions of multiple phospholipase Ds in stress response of *Arabidopsis*. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 813-817
- Wasteneys, G.O. (2002): Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *Journal of Cell Science* 115 (7): 1345-1354
- Wasteneys, G.O. (2004): Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Current opinion in plant biology* 7: 651-660
- Wasteneys, G.O., Yang, Z. (2004): New views on the plant cytoskeleton. *Plant Physiol.* 136: 3884-3891
- Watanabe, T., Osaki, M. (2001): Influence of aluminium and phosphorus on growth and xylem sap composition of *Melastoma malabathricum*. *Plant and Soil* 237: 785-792
- Watanabe, T., Osaki, M. (2002): Mechanisms of adaptation to high aluminium condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33: 1247-1260
- Watanabe, T., Jansen, S., Osaki, M. (2004): The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytol.* 165 (3): 773
- White, P.J. (1998): Calcium channels in the plasma membrane of root cells. *Annals of Botany* 81: 173-183
- White, P.J. (2000): Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 171-189

White, P.J., Broadley, M.R. (2003): Calcium in plants. *Annals of Botany* 92: 487-511

Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., Wasteneys, G.O. (2001): MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411: 610-613

Yang, J.L., Zheng, S.H., He, Y.F., You, J.F., Zhang, L., Yu, X.H. (2006): Comparative studies on the effect of a protein-synthesis inhibitor on aluminium-induced secretion of organic acids from *Fagopyrum esculentum* Moench and *Cassia tora* L. roots. *Plant, Cell and Environment* 29 (2): 240

Zakir Hossain, A.K., Koyama, H., Hara T. (2006): Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. *Journal Plant Physiol.* 163 (1): 39-47

Zhang, W.H., Rengel, Z. (1999): Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Australian Journal of Plant Physiology* 26 (5): 401-409

Zhang, W.H., Ryan, P.R., Tyerman, S.D. (2001): Malate-permeable channels and cation channels activated by Al in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiology* 125:1459-1472

Zheng, S.J., Ma, J.F., Matsumoto, H. (1998): High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117: 745–751