

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie rostlin



bakalářská práce

Regulace vývoje postranních kořenů

Eva Husáková

Praha 2006



Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Olga Votrubová, CSc.



186/06

Prohlašuji, že jsem předkládanou bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Dr. Olgy Votrubové a že nebyla předložena jako bakalářská práce na žádné jiné vysoké škole.

V Praze 5. 5. 2006

Husáková Eva
Eva Husáková

Rukopisy BP 3/2006
Bakalářské práce

Poděkování

- Dr. Olze Votrubové za odborné rady, trpělivost, ochotu a přátelský přístup,
- Dr. Aleši Soukupovi za pomoc při navrhování různých alternativních postupů projasňování kořenů, při řešení různých technických potíží a za cenné rady a připomínky,
- Mgr. Drahomíře Bartákové za všestrannou pomoc v laboratoři a při kultivaci,
- Doc. Evě Zažímalové za informace a rady z oblasti auxinu,
- všem ostatním doktorandům a diplomantům našeho týmu za přátelskou atmosféru a nezištnou pomoc,
- a všem ostatním členům z Katedry fyziologie rostlin v Praze,
- celé mé rodině za podporu při studiu, porozumění a psychickou podporu.

Seznam zkratk

1-NOA	kyselina 1-naftoxyoctová
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
4-Cl-IAA	kyselina 4-chloroindolyl-3-octová
G1 fáze	fáze buněčného cyklu následující po mitóze a předcházející replikaci DNA
G2 fáze	fáze buněčného cyklu následující po replikaci DNA a předcházející mitóze
CHPAA	kyselina 3-chlor-4-hydroxyfenyloctová
IAA ⁻	disociovaná forma IAA
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IAAH	nedisociovaná forma IAA
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
IL1, IL2	vnitřní vrstvy vznikající během vývoje primordia
LR	postranní kořen/y, lateral root/s
NAA	kyselina naftyl-1-octová
NPA	kyselina 1-N-naftylftalamová
OL1, OL2	vnější vrstvy vznikající během vývoje primordia
PAT	polární auxinový transport
pH	záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity protonů, charakterizující kyselost roztoků
S fáze	syntetická fáze, fáze buněčného cyklu mezi G1 a G2 fází
TIBA	kyselina 2,3,5-trijódbenzoová
Kontrola	varianta bez NAA
varianta A	varianta s koncentrací $5 \cdot 10^{-6}$ M NAA

Obsah

Abstrakt	1
1 Předmluva	2
2 Literární rešerše	3
.....	3
2.1 Postranní kořeny	3
2.1.1 Vznik postranních kořenů	3
2.1.2 Zakladatelské buňky a vznik primordia	5
2.1.3 Jednotlivá stádia vývoje postranních kořenů	8
2.1.4 Vynoření postranních kořenů	9
2.2 Regulace vývoje postranních kořenů	11
2.2.1 Faktory ovlivňující růst a vývoj postranních kořenů	11
2.2.2 Auxiny - jejich syntéza a transport	11
2.2.3 Vliv auxinů na vznik a vývoj postranních kořenů	15
2.2.4 Role PAT ve vývoji postranních kořenů	17
2.3 Závěr	18
3 Experimentální část	19
3.1 Vliv NAA na růst rostlin pšenice a strukturu kořenů	19
3.1.1 Materiál a metody	19
3.1.1.1. Rostlinný materiál	19
3.1.1.2. Kultivace rostlin	19
3.1.1.3. Statistické zpracování výsledků	21
3.1.2 Výsledky	21
3.1.3 Závěr	24
4 Seznam použité literatury	25

Abstrakt

Cílem práce je shrnutí dosavadních poznatků o vývoji postranních kořenů a významu auxinu pro regulaci jejich iniciace a růstu.

Postranní kořeny jsou nedílnou součástí kořenového systému rostlin. U vyšších cévnatých rostlin vznikají endogenně z pericyklu, přesně organizovaným dělením určitého počtu zakladatelských buněk ležících proti floému či xylému v závislosti na druhu rostliny. Jejich vznik je regulován vnějšími a vnitřními faktory, které spolu úzce souvisí. Regulace je silně propojena s fytohormonem auxinem.

Bylo zjištěno, že zdrojem auxinu (nejběžněji se vyskytující jako IAA, kyselina indolyl-3-octová) mohou potenciálně být téměř všechna pletiva rostliny, zejména mladé listy a meristémy primárních a postranních kořenů. Auxin je transportován z prýtu do kořenů dvěma vzájemně propojenými drahami - nepolárním a polárním transportem. Významnou úlohu má regulace polárního transportu, který v kořenech probíhá jak akropetálně tak i bazipetálně. Pro iniciaci primordií se zdá být důležitý akropetální transport, kdežto pro jejich růst bazipetální transport.

Změny v obsahu endogenních i exogenních auxinů u různých mutantů výrazně ovlivňují iniciaci a následný růst postranních kořenů. Též se ukázalo, že veškeré poruchy v transportu auxinů vyvolané buď exogenní aplikací inhibitorů polárního transportu, nebo vyvolané mutacemi genů pro vtokové či výtokové auxinové přenašeče se projevují různými negativními vlivy na vznik a vývoj postranních kořenů.

1 Předmluva

Rostliny jsou nedílnou součástí přírody. Téměř všechny se vyznačují svou neschopností aktivního pohybu z místa na místo, což způsobuje jejich plnou závislost na zdrojích a podmínkách vyskytujících se v jejich bezprostředním okolí. Vysoká heterogenita a proměnlivost těchto zdrojů způsobila, že se u rostlin vyvinula vyšší schopnost reagovat na změny faktorů prostředí. Značná vývojová plasticita umožňuje rostlinám velké množství výhod. Rostliny vnímají signály a informace z prostředí a rychle na ně reagují umístěním struktur do optimálních pozic s ohledem na vodu, živiny a sluneční záření (Malamy et al., 2001). Schopnost reagovat na změny podmínek prostředí je vymezena vnitřními faktory určenými genetickou výbavou. Tyto faktory vymezují jakési hranice plasticity rostlin v reakcích na vnější faktory danými prostředím, ve kterém se rostlina nachází (Malamy, 2005).

Jedním z příkladů výrazné vývojové plasticity u rostlin jsou i změny struktury kořenového systému vyvolané substrátem, ve kterém se nachází. Půda je velice heterogenní systém. Její vlastnosti, jako obsah a distribuce živin, hustota a typ půdních částic, dostupnost a distribuce vody, salinita, efekty sekundárních metabolitů rostlin, živočichů, mikroorganismů a jejich vzájemná interakce - to vše působí na architekturu kořenového systému, která je pro rostliny životně důležitá. Poskytuje rostlinám ukotvení v substrátu a zajišťuje jim příjem vody a živin. Správná architektura dovoluje rostlinám v daném prostředí přežít období sucha, deficit živin a efektivně využívat a soutěžit o půdní zdroje. Navíc rostlina má k dispozici pouze omezenou biomasu, kterou může do tohoto systému investovat (Malamy, 2005).

Vývoj orgánů dospělé rostliny je v naprosté většině postembryonální, což platí i u postranních kořenů, které jsou nedílnou součástí kořenového systému téměř všech cévnatých rostlin. Jejich nejdůležitější funkcí je zvýšení kapacity příjmu látek kořenovým systémem.

2 Literární rešerše

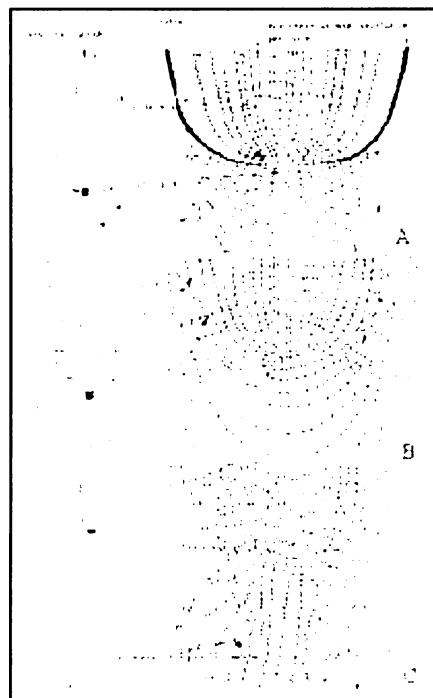
2.1 Postranní kořeny

2.1.1 Vznik postranních kořenů:

Postranní neboli laterální kořeny (dále LR) jsou nedílnou součástí kořenového systému rostlin. Vznikají endogenním způsobem v relativně konstantní vzdálenosti od iniciál apikálního meristému rodičovského kořene, který může mít různou stavbu (Dubrovský et al., 2000).

U kaprad'orostů vznik celého kořene zajišťuje jediná buňka (Charlton, 1991), kdežto u nahosemenných a krytosemenných rostlin je to soubor buněk, jejichž uspořádání je určeno typem organizace kořenového meristému (Esau, 1965).

Jsou popisována dvě základní uspořádání kořenového meristému. Otevřený typ organizace kořenového meristému se vyznačuje jedním souborem iniciál, který umožňuje vznik všech typům kořenových pletiv (**viz obr.1.C**). Tento typ architektury byl popsán např. u *Pisum sativum*, *Fagus sylvatica*, *Vicia faba* (Clowes, 1981) či *Picea* (Esau, 1965). Druhým typem je uzavřený typ apikální organizace, který obsahuje iniciály uspořádané v jednotlivých souborech, ze kterých vznikají různé části kořene (Chapman, 2003). Tento uzavřený typ lze dále rozdělit podle toho, zda určitý soubor iniciál dává vzniku pouze čepičce, či ještě jiné části kořene (převzato z Esau, 1965). První typ uzavřeného meristému, který se vyskytuje např. u *Triticum*, *Zea* (Clowes, 1981), *Stipa* (Esau, 1965) a jiných *Poaceae*, obsahuje tři jednotlivé soubory iniciál. Z vnitřního souboru vzniká střední válec



Obr.1 Typy organizací kořenového meristému (Esau, 1965)

A – uzavřený typ, *Stipa*

B – uzavřený typ, *Raphanus*

C – otevřený typ, *Picea*

včetně pericyklu, z dalšího souboru vznikají buňky primární kůry a epidermis a třetí soubor dává vznik pouze kořenové čepičce (**viz obr.1.A**). Druhý typ uzavřeného meristému se od prvního liší vnějším souborem iniciál, který dává vznik nejenom kořenové čepičce, ale i kořenové pokožce (**viz obr.1.B**). Tento typ byl nalezen např. u ředkvičky (Esau, 1965),

Arabidopsis a jiných *Brassicaceae*, u tabáku a jiných *Solanaceae* a u některých *Asteraceae* (Dolan et al., 1993).

Podrobnějším zkoumáním jednotlivých organizací u různých druhů a v různých stádiích vývoje rostlin bylo zjištěno, že tyto typy se mohou kombinovat a dokonce, že se mohou měnit v průběhu ontogeneze rostliny. Jako příklad může sloužit slunečnice z čeledi *Asteraceae*, u které byl zpočátku pozorován uzavřený typ organizace, kdežto ve starších rostlinách byl popsán otevřený typ (Dolan et al., 1993).

Typ organizace meristému rodičovského kořene však nemá žádný vliv na zakládání LR, které vždy u semenných rostlin vznikají endogenně z pericyklu. U nižších cévnatých rostlin byl jejich vznik pozorován v endodermis (Esau, 1965).

Pericykl je nejčastěji tvořen jednou souvislou vrstvou buněk na povrchu středního válce. Tento typ byl popsán např. u *Arabidopsis*, ředkvičky a slunečnice (Blakely et al., 1982; Laskowski et al., 1995). Nicméně byl pozorován i vícevrstevný a dokonce u některých rostlin, jako např. u mrkve či hrachu, pouze lokálně (Lloret et al., 1989). Navíc např. *Poaceae* a *Cyperaceae* se vyznačují přerušovaným pericyklem proti xylému, kde protoxylémové póly dosahují až k endodermis (von Guttenberg, 1968).

První LR jsou zakládány v akropetálním pořadí v tzv. diferenciační zóně v relativně velké vzdálenosti (např. u *Arabidopsis* cca 3-8mm; u *Vicia faba* minimálně 7mm) od apikálního meristému mateřského kořene, neboť ten inhibuje iniciaci LR ve svém okolí (Dubrovský et al., 2000; MacLeod a Thompson, 1979). Vzdálenost prvních založených LR od promeristému se liší u různých druhů nejen v závislosti na genetické informaci, ale zejména v závislosti na rychlosti růstu (Soukup et al., 2001), která je silně ovlivňována prostředím (Ploshchinskaya et al., 2002). Na rozdíl od iniciál apikálního meristému primárního kořene, které jsou ustanoveny během embryogeneze, formují se meristemické iniciály v LR postembryonálně (Laskowski et al., 1995).

Na vzniku LR se podílejí pouze některé buňky pericyklu, v závislosti na druhu dané rostliny. U některých druhů se vzniku LR účastní jen buňky pericyklu sousedící s xylémovými buňkami, kdežto u jiných pouze buňky v sousedství floémových buněk (Lloret et al., 1989). Tvorba LR proti floému byla pozorována převážně u jednoděložných rostlin, zejména u trav, jako např. kukuřice, žito, ječmene a pšenice, nicméně byla nalezena i u dvouděložné mrkve (Esau, 1965; Lloret et al., 1989). U dvouděložných rostlin, kam patří např. ředkvička, *Arabidopsis*, slunečnice a hrách, je tvorba LR častá naproti xylému, avšak tento způsob zakládání byl pozorován i u jednoděložné cibule (Laskowski et al., 1995; Esau, 1965; Lloret et al., 1989).

Byla pozorována i určitá souvislost polohy buněk pericyklu schopných dát vznik LR, s počtem vrstev samotného pericyklu. Jako příklad může sloužit mrkev. U těchto rostlin vznikají LR z buněk pericyklu umístěných poblíž floému. V těchto místech je pericykl jednovrstevný, kdežto naproti xylému je dvouvrstevný. Jiným příkladem může být hrách, kde LR vznikají z mnohvrstevného pericyklu sousedícího s xylémem, zatímco pericykl blíže floému je jednovrstevný (Lloret et al., 1989).

2.1.2 Zakladatelské buňky a vznik primordia:

Detailní studie vzniku LR bohužel pocházejí jen z omezeného počtu rostlinných druhů. Ve starších pracích byly sledovány a popsány zejména kořenové soustavy cibule, ředkvičky a kukuřice. Dnešní studie se zabývají zejména kořeny *A.thaliana*, které poskytují vynikající systém pro studium vývoje kořenů, neboť uspořádání buněk primárního i LR je celkem jednoduché a metodicky snadno dostupné (Malamy a Benfey, 1997).

Mnoho autorů popsal, že u některých druhů obsahuje pericykl buňky dvou různých velikostí. U *Arabidopsis*, kde jak již bylo uvedeno se LR tvoří z buněk pericyklu ležících poblíž xylému, byly v těchto místech nalezeny přibližně dvakrát kratší buňky pericyklu než buňky ležící naproti floému. Totéž bylo pozorováno u ředkvičky, kde buňky pericyklu sousedící s xylémem byly třikrát kratší než buňky pericyklu sousedící s floémem (Laskowski et al., 1995). Stejný případ byl sledován u cibule a hrachu. U mrkve byly kratší buňky pericyklu také nalezeny v místech tvorby LR, tedy naproti floému (Lloret et al., 1989). Podrobnějšími studiemi, kterými se zabývali zejména Beeckman et al., 2001, bylo později zjištěno, že tyto pozorované jevy jsou zapříčiněny větším množstvím příčných dělení v buňkách pericyklu ležících v místech tvorby LR, tedy např. u *Arabidopsis* naproti xylému.



Obr.2 Příčný řez středním válcem kořene *A.thaliana*, diarchní stélé (Dubrovský et al., 2001) pp-protofloém, px-protoxylém, -buňky pericyklu úsečka = 10 μ m, řez 6mm od kořenové špičky

Dubrovský et al., 2001 ve své práci pozorovali, že u *Arabidopsis* nejpravděpodobněji vznikají postranní kořeny ze třech řad buněk pericyklu, které se nacházejí proti protoxylému. Laskowski et al., 1995 na příčných řezech zjistili, že tyto buňky pericyklu se vyznačují jedenkrát až třikrát větší velikostí oproti ostatním buňkám pericyklu (viz obr.2). Nicméně

některé práce, včetně Dubrovského et al., 2001, naznačují, že primordia mohou vznikat i z menšího množství buněk pericyklu sousedících s xylémovým pólem.

Formování primordia může být shrnuto do dvou fází. V první fázi je stimulována dělivá aktivita a proliferace buněk pericyklu, tzn. utváření populace zakladatelských buněk. V druhé fázi deriváty těchto buněk formují primordium, v němž probíhá organizace meristému, který je posléze schopný vytvoření LR (Laskowski et al., 1995).

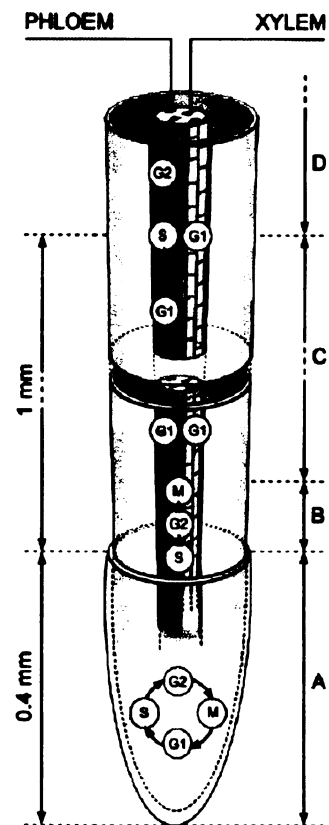
První kontrolní bod při formování nového LR je tedy určení zakladatelských buněk (*founder cells*). Tyto buňky jsou vlastní buňky pericyklu (u *Arabidopsis* na xylémovém pólu), které dávají vznik primordiu postranního kořene. Utvářejí se brzy poté, co buňky pericyklu opustí zónu meristému (Dubrovský et al., 2000; Beekman et al., 2001). V literatuře se stále objevují konfliktní názory různých autorů na to, ve které fázi buněčného cyklu se buňky pericyklu nacházejí (zda v G1 a/nebo v G2 fázi). Nicméně Beekman et al., 2001 dokázali vytvořit model, který vyhovuje všem názorům. Podle tohoto modelu popisujícího kořeny *Arabidopsis*, buňky pericyklu s rostoucí vzdáleností od apikálního meristému postupně zastavují svůj buněčný cyklus v G1 fázi. Za distálním koncem kořenového vrcholu (tedy cca 1,4mm od kořenové špičky), buňky pericyklu na xylémovém pólu však postupují přes S fázi do G2 fáze buněčného cyklu a tím se stávají kompetentní pro iniciaci primordia. Nicméně bylo zjištěno, že pouze některé dělicí se buňky pericyklu procházejí asymetrickým formativním¹⁾

dělením, které vede ke vzniku primordia. Ostatní buňky pericyklu zůstávají v G1 fázi (viz obr.3).

Zakladatelské buňky mohou vznikat třemi různými způsoby (Dubrovský et al., 2000):

1. prodlužující se buňky se mohou přímo stát zakladatelskými buňkami
2. tyto buňky předtím procházejí formativním dělením
3. buňky nejprve podstupují proliferativní dělení a poté formativní dělení.

¹⁾ Pojem „formativní dělení“ zde označuje asymetrické dělení, kterým vznikají dcerné buňky s odlišným osudem (Dubrovský et al., 2001)

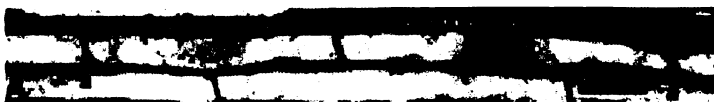


Obr. 3 Model regulace buněčného cyklu v pericyklu před iniciací prvního primordia u *A.thaliana* (Beekman et al., 2001)

A – zóna apikálního meristému, všechny buňky se aktivně dělí
B – zóna 100-200μm, vnější buňky kořene opouští buněčný cyklus a stávají se diferencované, ostatní buňky pokračují v dělení
C – buňky pericyklu zastavené v G1 fázi
D – buňky xylému postupují do G2 fáze a stávají se kompetentní pro iniciaci primordia.

Byly popsány dva způsoby dělení zakladatelských buněk pozorovaných u *Arabidopsis* (ne oba v jednom kořeni), které určují počátek iniciace primordií (Dubrovský et al., 2001):

1. podélný jednobuněčný typ (*longitudinal uni-cellular*) - v tomto případě jediná zakladatelská buňka charakteristická jednou či oběma konvexními buněčnými stěnami se antiklinálně dělí a vzniklé buňky jsou přibližně stejné délky (**viz obr.4**)
2. podélný dvoubuněčný typ (*longitudinal bi-cellular*) - zde dvě sousedící zakladatelské buňky v jedné řadě se asymetricky dělí. Vzniklé kratší buňky jsou orientovány směrem k sobě a tvoří střed primordia (**viz obr.5**).



Obr.4 Podélný jednobuněčný typ u *A.thaliana*. Stádium po prvním antiklinálním dělení. Šipky ohraničují zakladatelské buňky. (Dubrovský et al., 2001), úsečka=20 μ m



Obr.5 Podélný dvoubuněčný typ u *A.thaliana*. Delší šipky označují rovinu prvního antiklinálního dělení, kratší šipka označuje konec buněčné stěny jedné zakladatelské buňky. (Dubrovský et al., 2001), úsečka = 20 μ m

Minimální počet zakladatelských buněk dávající vznik primordiu závisí na druhu rostliny. U *Vicia faba* bylo zjištěno 24 těchto buněk (MacLeod a Thompson, 1979) a u ředkvičky 30 (Blakely et al., 1982). Laskowski et al., 1995 se domnívali, že u *Arabidopsis* je tento počet 11, kdežto Dubrovský et al., 2001 zjistili, že postačují 3 buňky. Toto nadhodnocení u Laskowského et al., 1995 bylo zapříčiněno předchozím ošetřením kořenů auxinem, což způsobilo, že prakticky všechny buňky pericyklu v protoxylémovém pólu se začaly aktivně dělit.

Během vývoje primordia ředkvičky pozorovali Blakely et al., 1982 podskupinu buněk v buňkách pericyklu sousedících s protoxylémem. Podle jejich tvaru připomínajícího klín byly nazvány klínovité buňky (*cuneiform cells*). Blakely et al., 1982 věřili, že tyto buňky jsou velice významné pro časná stadia vývoje LR. Naopak Laskowski et al., 1995 zformování těchto buněk během vývoje primordia u *Arabidopsis* nepozorovali, proto je nepovažují za nezbytně nutný krok tvorby LR.

Existují i rozdíly v trvání buněčných cyklů měřených v časných stádiích vývoje LR. U ředkvičky byl tento čas stanoven na 5 - 6 hodin (Laskowski et al., 1995), u *Pisum sativum* 2,9 hodin, u *Vicia faba* 8,2 hodin a u *Zea mays* 4,5 hodiny (MacLeod a Thompson, 1979).

Bylo zjištěno, že LR se utvářejí podle určitého vzorce v podélných řadách (*ranks*). Uvnitř jedné řady je uspořádání relativně pravidelné, nicméně je značně ovlivňováno podmínkami, ve kterých kořen roste (Charlton, 1987; Charlton, 1991). Existují dva pohledy na dobu, kdy dochází k určení tohoto vzorce. Buď je vzorec uložen v kořenovém apexu jako část obecného procesu produkce buněk a determinace pletiv. Nebo je vzorec určen později a to hormonálně a díky dalším morfogenům (Blakely et al., 1982).

2.1.3 Jednotlivá stádia vývoje postranních kořenů:

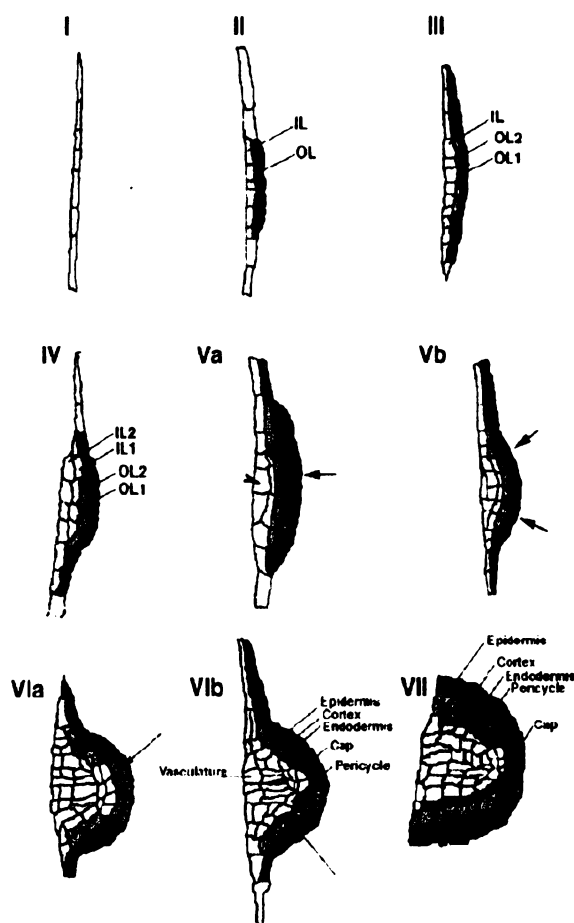
Stádia vývoje LR lze shrnout do osmi jednotlivých kroků, jak je ve své práci na modelu *Arabidopsis* detailně popsali Malamy a Benfey, 1997 (viz obr.6). Přesto, že v pozdějších stádiích lze špatně rozeznat a tím i popsat jednotlivá dělení buněk, proliferují buňky ve všech krocích organizovaně (Blakely et al., 1982).

První známky iniciace primordia souvisejí s velkým množstvím antiklinálních dělení zakladatelských buněk, tj. dělení orientovaných kolmo na povrch. Tímto vzniká 8 - 10 krátkých buněk pericyklu, které radiálně zvětšují svoji velikost (obr.6, fáze I.).

Poté následuje řada periklinálních dělení (tj. dělení orientovaných rovnoběžně s povrchem) dávajících vznik nejprve dvouvrstevnému primordiu, jehož vrstvy se označují OL (outer layer) a IL (inner layer). Ty se pak dále periklinálně dělí a postupně vzniká třívrstevné primordium s vrstvami OL1, OL2 a IL a následně čtyřvrstevné primordium s vrstvami OL1, OL2, IL1 a IL2 (obr.6, fáze II.-IV.).

Již u dvouvrstevného stádia se začíná objevovat charakteristický vypouklý tvar primordia. Ten je způsoben tím, že se těchto periklinálních dělení účastní nejprve pouze buňky ze střední části vznikajícího primordia. U *Arabidopsis* primordium obsahující čtyři vrstvy již proniká endodermis rodičovského kořene.

Laskowski et al., 1995 (též u *Arabidopsis*) zjistili, že ve fázi 3 - 4 vrstev se primordium z neautonomního meristému plně závislém na řízení rodičovským kořenem, plynule přetváří na autonomní meristému. V další fázi se centrální buňky obou vrchních vrstev antiklinálně dělí a tím vznikají 4 malé buňky kostkovitého tvaru. Do dělení se zapojují i další dvojice s nimi sousedících buněk. V tomto kroku OL1 obsahuje 10 - 12 buněk. Navíc buňky IL2 se radiálně zvětšují, dělí se a vytlačují vrchní vrstvy směrem kolmo od osy rodičovského kořene. Tím



Obr.6 Model vývoje primordia LR u *A.thaliana*
 IL-inner layer, OL- outer layer
 (Malamy a Benfey, 1997)

kořenové špičce. Dají se rozlišit tři vrstvy patřící budoucí epidermis, primární kůře a endodermis, které obklopují jádro stelárních pletiv, a na špičce je kořenová čepička (**obr.6, fáze VIb**).

V poslední fázi před emergencí je již velice těžké a téměř nemožné rozeznat jednotlivá dělení, mimo antiklinálního v OL1 vrstvě. Zde vznikají buňky podle jistého vzorce označovaného: 8-8-8. To znamená 8 buněk nacházejících se uprostřed vnější vrstvy a 8 buněk ležících z každé strany (**obr.6, fáze VII**).

2.1.4 Vynoření postranních kořenů:

Přestože se počátky vývoje primárních kořenů (embryonálního meristému) a laterálních kořenů (postembryonálního meristému) dost liší, jakmile se primordium LR dostane na

dochází ke stlačení vrstev IL1 a OL2. V této fázi se již nové primordium nachází uprostřed primární kůry rodičovského kořene (**obr.6, fáze Va, Vb**).

Dále následují 2 kroky obsahující více událostí najednou. Jednotlivé vrstvy jdou již špatně rozeznat, díky obrovskému nárůstu množství dělení.

Buňky v OL2 vrstvě se opět periklinálně dělí, čímž se vytváří další nová vrstva. Stejným způsobem se dělí i 4 krátké buňky kostkovitého tvaru uprostřed vrstvy OL1.

Primordium obsahující nyní ve vnější vrstvě 12 buněk prorůstá celou primární kůrou rodičovského kořene a proráží jeho epidermis (**obr.6, fáze VIa**).

Uprostřed se objevují protáhlé buňky mající charakteristický tvar prokambióálních elementů a primordium se začíná velice nápadně podobat dospělé

povrch rodičovského kořene, stávají se tyto struktury svou organizací dosti podobné (Scheres et al., 1994; Laskowski et al., 1995).

Emergence, čili vynoření primordia na povrch rodičovského kořene nastává u *Arabidopsis* ve stádiu 8 - 10 vrstev buněk. Tato fáze se vyznačuje růstem nového kořene¹⁾ do délky, který je zpočátku zajišťován zvětšováním buněk na bázi kořene. Naopak vnější oblasti primordia zůstávají téměř neměnné (Malamy a Benfey, 1997).

Vývoj primordia u mnoha druhů rostlin bývají spojena s dočasnými strukturami, které jsou odvozené z pletiv ležících vně pericyklu. Van Tieghem and Douliot, 1888 popsali, že tato struktura vzniká z endodermis a z některých vně ležících struktur; nazvali ji „*Poche digestive*“. Von Guttenberg, 1968 omezil původ této struktury pouze na endodermis a nazval ji „*Tasche*“. V podstatě jsou ale tyto struktury totožné (Bell a McCully, 1970). Funkcí těchto struktur je především ochrana primordia a usnadnění emergence (Charlton, 1991). U *Convolvulus arvensis* Bonnet, 1969 pozoroval, že se nejprve na povrchu primordia dočasně vytvořila „*Tasche*“ struktura, která sekretovala váčky. Tyto váčky vznikající zřejmě v diktyzomech byly nalezeny ve vnějších buňkách této struktury. Jejich obsah tvořily zřejmě hydrolytické enzymy, které způsobovaly v přilehlých kortikálních buňkách rozpuštění jejich protoplastu a lyzi.

U rostlin, které netvoří tyto dočasné struktury, prorůstají pravděpodobně primordia z rodičovských kořenů pouze mechanickou silou (Charlton, 1991). Bell a McCully, 1970 pozorováním *Zea mays* zjistili, že se tyto dva způsoby zřejmě mohou kombinovat. U tohoto druhu nejprve primordium vytvořilo dočasnou „*Tasche*“ strukturu, která byla po dosažení vnějších lignifikovaných vrstev hlavního kořene nahrazena mechanickým tlakem.

Při pronikání primordia skrz rodičovská pletiva dochází k porušení pletiv ležících vně od pericyklu, čímž vzniká možnost nekontrolovatelného vstupu látek, včetně patogenů. Rostliny proto vytvářejí různé struktury, např. suberinizací, lignifikací buněk (u obilnin) nebo akumulací fenolů (u *Hieracium*) (Peterson, 1979). Účelem vzniklých struktur je obnovení apoplastických bariér a kontinua povrchu rostlinného orgánu (Charlton, 1991).

Vývoj LR končí diferenciací floému a xylému v primordiu a jejich následným napojením na floém a xylém rodičovského kořene. Toto spojení probíhá pomocí diferenciací buněk pericyklu na vodivé elementy na proximálním konci primordia (Esau, 1965).

²⁾ V této chvíli by se již nemělo používat názvu primordium, nýbrž správněji laterální kořen.

2.2 Regulace vývoje postranních kořenů

2.2.1 Faktory ovlivňující růst a vývoj postranních kořenů:

LR mohou být ovlivňovány vnějšími (exogenními) i vnitřními (endogenními) vlivy. Z vnějších faktorů to mohou být - světlo, působící na kořeny prostřednictvím prýtu (Reed at al., 1998), teplota, voda (Malamy, 2005), mechanické působení a různé chemikálie, jako např. NaCl a těžké kovy (Taiz a Zeiger, 2002). Důležitou roli hrají také živiny, především nitráty a fosfáty (Casimiro et al., 2003; Malamy, 2005). Do vnitřních faktorů se mohou řadit fytohormony, zejména auxin a cytokininy (Hinchee a Rost, 1986; Wightman a Thimann, 1980). V poslední době se též hodně diskutuje role sacharidů, zejména sacharosy (Malamy a Ryan, 2001). Tyto vnější a vnitřní faktory spolu vzájemně souvisejí. Určité propojení existuje například u vlivu živin s auxiny.

2.2.2 Auxiny - jejich syntéza a transport:

Ze skupiny pěti hlavních rostlinných hormonů je auxin považován za jeden z nejdůležitějších a je zároveň nejprozkoumanějším signálem pro vývoj kořenového systému a zejména jeho LR (Laskowski et al., 1995; Casimiro et al., 2001). Uplatňuje se během iniciace budoucího LR, organizace apikálního meristému uvnitř primordia, emergence a následného růstu nového LR (Malamy a Ryan, 2001). Hraje klíčovou úlohu v gravitropické reakci kořenového systému (Friml et al., 2002a; Rashotte et al., 2000).

Název auxin pochází z řeckého slova *auxein*, což znamená růst, prodlužovat se. Největší podíl ve vyšších rostlinách má strukturně celkem jednoduchý derivát indolu IAA (kyselina indolyl-3-octová), který je spolu s několika dalšími jako např. 4-Cl-IAA (kyselina 4-chloroindolyl-3-octová), která byla nalezena u hrachu a IBA (kyselina indolyl-3-máselná) u hořčice a kukuřice, zahrnován do skupiny přírodních auxinů. Pro studium funkcí auxinu se užívá hlavně syntetická forma NAA (kyselina naftyl-1-octová) a v menší míře též 2,4-D (kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová) (Taiz a Zeiger, 2002).

Podle původního předpokladu byla syntéza auxinu lokalizována výhradně ve vrcholech prýtu. Sledováním nadzemních částí rostliny byla syntéza *de novo* detekována zejména v mladých listech a v dělohách, přičemž největší kapacitu syntézy mají mladé listy. Ljung et al., 2001 zjistili, že při zvětšování jejich velikosti se postupně snižuje hladina auxinů,

až stokrát. Pozdější výsledky ze sledování transportu auxinů z nadzemních zdrojů do kořenů a ze sledování projevů při pokusech s odstraňováním různých částí rostliny prokázaly, že auxin může být potenciálně produkován téměř všemi částmi rostlinného těla. Podrobným měřením míry syntézy v podzemních částech byla nejintenzivnější syntéza lokalizována v meristému. Nicméně i v dalších částech kořene byla *de novo* syntéza signifikantní (Ljung et al., 2005).

Auxinový transport ve vyšších rostlinách je regulovaný proces podílející se na regulaci vývoje a růstu rostliny (Paciorek a Friml, 2006). Bylo zjištěno, že jsou transportovány přirozené i syntetické auxiny. Transport probíhá dvěma různými cestami, které se doplňují a navzájem na sebe navazují.

První z těchto cest probíhá v rostlině **nepolárně**. Tento druh transportu bývá označován jako transport na dlouhou vzdálenost. Probíhá ve floému, ve kterém je auxin transportován hromadným tokem spolu s ostatními metabolity, čemuž odpovídá i rychlost toku 5 - 20cm/h (Friml a Palme, 2002). Směr toku závisí na umístění metabolických sinků, proto je tento transport energeticky nenáročný (Swarup et al., 2001).

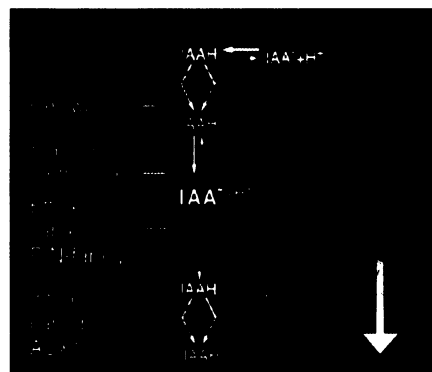
Zdá se, že auxin je jako jediný známý rostlinný růstový hormon transportován také jednosměrně **polárním transportem** (Leyser, 2001). Polární auxinový transport (dále PAT) představuje typ transportu na krátkou vzdálenost, který probíhá z buňky do buňky (*cell-to-cell*) (Rashotte et al., 2000). Je zprostředkován specifickými přenašeči, což způsobuje jeho nižší rychlost, kolem 5 - 20mm/h, a vyšší energetickou náročnost (Friml a Palme, 2002). Z těchto důvodů je citlivý na nedostatek kyslíku, čehož se spolu s inhibitory PAT (*fytotropiny*), využívá při studiích účinků PAT na různé vývojové procesy. Nejznámější z inhibitorů jsou používané NPA (kyselina 1-N-naftylftalamová) a TIBA (kyselina 2,3,5-trijodbenzoová), které blokují auxinový výtok (Friml a Palme, 2002; Boerjan et al., 1995). V poslední době se také začaly používat inhibitory vtoku auxinů, jako např. 1-NOA (kyselina 1-naftoxyoctová) nebo CHPAA (kyselina 3-chlor-4-hydroxyfenyloctová), jejichž aplikace vyvolávají symptomy podobné mutantu *aux1*. Nicméně dosud se používají podstatně méně než inhibitory výtoku (Parry et al., 2001).

V nadzemních částech rostliny probíhá PAT od vzrostného vrcholu stonku směrem k jeho bázi, tedy bazipetálně. Auxin je transportován podél cévních svazků, v parenchymu obklopujícím cévní svazky, v prokambiu, eventuálně v nezralých xylémových elementech (Morris a Thomas, 1978 - popsáno u *Pisum sativum*; Morris et al., 2004 u *Arabidopsis*).

V kořenech je auxin transportován buňkami středního válce směrem k jejich špičce, tedy akropetálně. Odtud postupuje vnějšími vrstvami kořene, pravděpodobně skrz epidermis

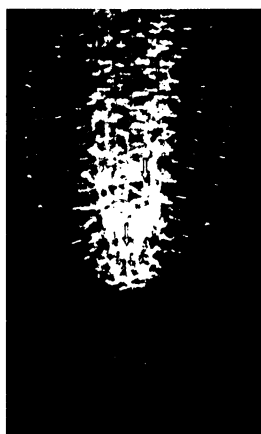
a/nebo vnější vrstvy primární kůry, směrem k jeho bázi, tedy bazipetálně. Tento „obrat“ ve směru toku auxinu kořenem bývá popisován jako „*fountain-model*“ (Benková et al., 2003).

Pro transport auxinu na úrovni buňky je podstatných několik mechanismů. V roce 1970 byla navržena chemiosmotická hypotéza (Jacobs a Gilbert, 1983) (viz obr.7), podle které IAA vstupuje do buněk přes plazmatickou membránu buď pasivně v nedisociované lipofilní formě (IAAH) nebo aktivním symportem v aniontové formě (IAA⁻) s dvěma protony.



Obr.7 Schéma chemiosmotické hypotézy (Friml, 2003).

pH cytoplasmy (pH~7) je vyšší než pH v prostoru buněčné stěny (pH~5,5), proto molekuly auxinu, které jsou slabé kyseliny, po překročení plasmatické membrány snadno disociují a díky svému náboji, který jim znemožňuje samovolný průchod plasmatickou membránou, jsou „lapeny“ v buňce (Leyser, 2005). Tento gradient pH je udržován aktivitou protonových pump, H⁺ATPáz, umístěných na plasmatické membráně (Taiz a Zeiger, 2002). Aktivní přenos auxinu přes plasmatickou membránu dovnitř a ven z buňky je zprostředkován vtokovými a výtokovými přenašeči. Aktivní přenos do buňky zajišťují auxinové vtokové přenašeče zvané AUX1, které byly nalezeny u *Arabidopsis* (Swarup et al., 2001). Naopak k přenosu iontů auxinu z buňky slouží zřejmě auxinové výtokové přenašeče zvané PIN proteiny (Benková et al., 2003). Stále však zůstává otázkou, zda PIN jsou vlastní transportéry, nebo jsou jen částí regulačního mechanismu, který řídí lokalizaci těchto transportérů (Leyser, 2005).

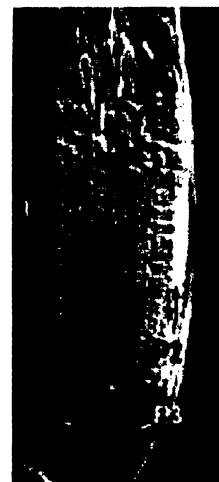


Obr.8 Imunolokalizace AtPIN proteinů v koř. špičce *A.thaliana*. (Friml a Palme, 2002).
červené šipky - AtPIN1
zelené šipky - AtPIN2
modré šipky - AtPIN4

PIN je rodina osmi proteinů, která kontroluje auxinovou distribuci a tím i některé aspekty regulace buněčného dělení a buněčného růstu (Paponov et al., 2005; Blilou et al., 2005). Protein PIN1 je ve stonku lokalizován v souladu s bazipetálním PAT na bazální straně prodlužujících se parenchymatických buněk xylému a buněk kambia (Gälweiler et al., 1998). V kořenech byl detekován v iniciálách vodivého pletiva a jejich derivátech (viz obr.8 - červené šipky). Ukázalo se, že tato oblast se částečně překrývá s oblastí výskytu proteinu PIN4 (Friml et al., 2002b; Paponov et al., 2005). Menší výskyt PIN1 byl též pozorován

v epidermis a v primární kůře kořene (Blilou et al., 2005). Protein PIN4 je lokalizován polárně směrem k iniciálám kolumely, tedy místu akumulace auxinu v kořenové špičce.

Mutant tohoto proteinu *pin4* se vyznačuje defektem v ustavení a udržení endogenního gradientu auxinu (Friml et al., 2002b) (viz obr.8 - modré šipky). Poté je auxin veden bazipetálním transportem, který ho přemísťuje do prodlužovací zóny kořene. Tento transport je zajištěn proteiny PIN2, které jsou umístěny polárně na horních stranách buněk epidermis, v boční kořenové čepičce a převážně na bazální straně buněk primární kůry (Müller et al., 1998; Paponov et al., 2005) (viz obr.8 - zelené šipky). V buňkách kolumely a po stranách buněk pericyklu ležících v prodlužovací zóně byla zjištěna přítomnost proteinu PIN3 (Friml et al., 2002a). Ten svou relokací umožňuje kořenu vnímat a odpovídat na gravitační stimul (Friml a Palme, 2002). Pátým výtokovým přenašečem vyskytujícím se v kořenech je PIN7. Je lokalizován na boku a na bazální straně prokambiólních buněk v meristematické a prodlužovací zóně a též byl nalezen v buňkách kolumely, kde se překrývá s oblastí lokalizace PIN3 (Blilou et al., 2005).



Obr.9 Schéma distribuce auxinu pomocí PIN
(Blilou et al., 2005)
zelené šipky - AtPIN1
červené šipky - AtPIN2
žluté šipky - AtPIN3
fialové šipky - AtPIN4
modré šipky - AtPIN7

Blilou et al., 2005 ve své práci navrhuje úpravu klasického fontánového modelu popisující distribuci auxinu v kořeni (viz obr.9). Domnívají se, že PIN výtokové přenašeče, zejména PIN2, PIN3 a PIN7 svou specifickou orientací na plasmatické membráně buněk vnějších vrstev kořene umožňují zpětný tok (*auxin reflux loop*) auxinu do

jeho vnitřních vrstev. Tento systém umožňuje kořenům určitou nezávislost na auxinu dopravovaném z nadzemních částí rostliny.



Obr. 10 Imunolokalizace hematoglutinin-AUX1 ve špičce kořene, konfokální mikroskop. úsečka = 20 μm
(Swarup et al., 2001)

PAT a floémový transport jsou fyziologicky odlišné a prostorově oddělené cesty. Prostřednictvím experimentů s radioaktivně značenou IAA se však zjistilo, že IAA původně obsažená ve floému byla po určité době nalezena v PAT (Morris a Thomas, 1978). Existuje tedy určitá vazba mezi floémovým transportem a PAT. Později bylo zjištěno, že určitou roli v tomto propojení hraje asymetrická lokalizace proteinu AUX1 u *Arabidopsis* (Friml a Palme, 2002). V kořenech je protein silně exprimován v pletivech středního válce, v buňkách kolumely kořenové špičky, v části buněk středního válce apikální části kořene, které navazují na funkční floém a v epidermálních buňkách kořene (Swarup et al., 2001) (viz obr.10).

2.2.3 Vliv auxinů na vznik a vývoj postranních kořenů:

Výsledky dnes již klasických prací ukazují, že exogenní aplikace IAA k rostoucím rostlinám stimuluje u většiny druhů vývoj a emergenci LR (Blakely et al., 1982) a naopak odnětím vrcholů prýtu a kořene či aplikací inhibitorů auxinu dochází k inhibici vývoje LR (Casimiro et al., 2001). Pokusy s dekapitací děloh u *Pisum sativum* ukázaly, že dochází ke kompletní inhibici emergence LR (Wightman a Thimann, 1980). Na iniciaci LR však odstranění děloh nemělo téměř žádný vliv. Pokud ale byla absence děloh nahrazena přidáním vyššího množství IAA do řezné rány, došlo k částečnému obnovení iniciace a emergence LR (Hincee a Rost, 1986).

Při pokusech s odstraněním kořenového meristému, u hrachu a *Arabidopsis*, došlo k mírnému zvýšení celkového počtu založených a prorostlých LR ve zbylé části kořene (Hincee a Rost, 1986; Wightman a Thimann, 1980; Reed et al., 1998), což může souviset s odstraněním zdroje dalších rostlinných hormonů, např. cytokininů a ztrátou akropetální sekvence vývoje LR (Feldman, 1984).

Takovéto typy prací vedly k výzkumu role transportních toků auxinu v regulaci specifických stádií vývoje LR (Bhalerao et al., 2002). Ukázalo se, že PAT je klíčový pro regulaci jednotlivých stádií vývoje LR. Další práce se tedy zaměřily na tento typ transportu a začaly zkoumat vliv auxinových specifických inhibitorů. Využily poznatků, že jejich účinek závisí na použité koncentraci a lokalizaci jejich aplikace. Čím vyšší použily koncentraci, tím výraznější byla inhibice vývoje LR. Ukázalo se, že inhibitor NPA má lokální efekt na kořenová pletiva a vývoj LR ve vzdálených místech může ovlivnit pouze při aplikaci do bazální části kořene (Reed et al., 1998).

Na základě těchto a mnoha dalších prací se začal zkoumat účinek auxinu přímo na určitá stádia vývoje LR. Zjistilo se, že auxin svou akumulací v místě budoucího primordia ovlivňuje fázi těsně předcházející antiklinálnímu dělení, která charakterizuje prvopočátek iniciace základu budoucího kořene. Při sledování vývoje primordia u *Arabidopsis* se zjistilo, že buňky pericyklu na xylémovém pólu postupují dělení do G2 fáze buněčného cyklu, kdežto ostatní buňky pericyklu zůstávají v G1 fázi (Beekman et al., 2001). Zůstává zatím nejasné jak rostliny kontrolují reaktivaci buněčných cyklů během vývoje, ale s největší pravděpodobností hrají hlavní roli rostlinné hormony, zejména právě auxiny, které zřejmě stimulují v předem určených buňkách přechod G1-S fáze buněčného cyklu negativní regulací transkripce CDK-inhibičních proteinů KRP2 (*Kip-Related Protein 2*) (Himanen et al., 2002). Toto tvrzení bylo podpořeno i pozorováním Casimira et al., 2001, kteří zjistili, že při použití inhibitoru PAT

bylo efektivně zablokováno první formativní dělení důležité pro iniciaci LR. Souhrnně lze tedy říci, že auxin hraje jednu z klíčových rolí již při určení zakladatelských buněk v pericyklu (Malamy, 2005).

Auxin neovlivňuje pouze první stádia iniciace LR, tedy vznik zakladatelských buněk, ale působí i na další stádia vývoje (Benková et al., 2003). Byl vytvořen model přemístování auxinu během různých fází vývoje primordia. Předpokládá se, že klíčovou roli hrají PIN výtokové přenašeče, které jsou exprimovány v časných stádiích vzniku primordií, mimo PIN2. Ten se objevuje až po vynoření primordia z primárního kořene (viz obr.11). PIN lokalizace přesměrovává auxinový tok a tím ustavuje lokální auxinové gradienty potřebné pro celý vývoj LR. V prvních fázích se tedy auxin akumuluje



Obr.11 Model transportu auxinu během vývoje LR upraveno. (Benková et al., 2003)

v místech budoucího primordia, z nichž se posléze transportuje do jeho špičky, kde se hromadí. V primordiích vyrůstajících z rodičovského kořene se největší obsah auxinu nachází v kolumele a iniciálách (Benková et al., 2003). Poté se stává primordium schopné syntetizovat svůj vlastní auxin (Bhalerao et al., 2002).

Důležitou funkci hraje v transportu auxinu a tím i v tvorbě LR předpokládaný vtokový auxinový přenašeč AUX1. Jednou z jeho funkcí je usnadňovat vstup IAA do vodivých pletiv. Další funkcí je role v postfloémovém odčerpávání IAA v pletivech kořenového apexu, čímž je regulována míra iniciace LR. Třetí rolí je usnadnění bazipetálního transportu v kořenech. Tyto skutečnosti byly potvrzeny pozorováním, že při ztrátě AUX1 aktivity dochází v kořenové špičce k redukci hladiny IAA a k blokování bazipetální auxinové redistribuce (Swarup et al., 2001).

U mutantů, u nichž je ovlivněn např. obsah nebo transport IAA, jsou obvyklým fenotypovým projevem poruchy tvorby a růstu LR (Casimiro et al., 2003).

Mutanti s poruchou transportu mezi nadzemními a podzemními orgány modifikují architekturu LR *A.thaliana*. K nim se řadí např. mutant *tir3* (*transport inhibitor response*) který obsahuje menší množství NPA-vazebných míst, což vede k nižší tvorbě, až úplné inhibici vývoje LR (Ruegger et al., 1997). Kořenová architektura u mutantu *stm1* (*shootmeristemless1*) ztrácí akropetální vzorec vývoje LR (Casimiro et al., 2001). Tato ztráta je způsobena neschopností tvořit listová primordia, což způsobuje snížený tok auxinů z prýtu do kořenů, jenž je důležitý pro emergenci LR (Bhalerao et al., 2002).

Další série mutantů *A.thaliana*, tzv. *alf* mutanti (*aberant lateral root formation*), pozastavují formování LR v různých stádiích svého vývoje. Mutant *alf1* se vyznačuje

zvýšenou hladinou IAA, což se projevuje nadměrnou tvorbou LR. *alf 3* mutace zastavuje vývoj LR těsně po jeho vynoření z rodičovského kořene a *alf 4* mutace blokuje iniciaci LR. *alf3* může po přidání exogenních auxinů obnovit vývoj svých LR, kdežto *alf4* na přítomnost exogenních auxinů nereaguje. Specificky zasažená iniciace LR je také u mutantu *slr* (*solitary root*), který nezakládá LR a nejde kladně ovlivnit přidáním exogenních auxinů (Celenza et al., 1995).

Při studiu mutantů *aux-1* (*auxin - resistant*) se zjistilo, že nesou agravitropní fenotyp, způsobený poruchou akumulace IAA v kořenovém apexu (Swarup et al., 2001). Z toho lze usoudit, že auxinový vtok je limitující faktor rovněž pro gravitropismus kořenů (Marchant et al., 2002). Tyto auxin - rezistentní mutanti zakládají až o polovinu méně primordií než kontrolní rostliny a tudíž se projevují redukováným počtem LR (Hobbie a Estelle, 1995). Swarup et al., 2001 popsali, že je možné podpořit normální fenotyp přidáním lipofilního auxinu NAA, nikoliv však 2,4-D, což je způsobeno vysokou polaritou tohoto analogu, která znemožňuje jeho vstup do buňky prostou difúzí.

Mutanti s redukovanou citlivostí k auxinu se projevují redukcí či ztrátou LR (Malamy, 2005). Mutant *dgt* (*diageotropica*) u rajčete neprodukuje žádné LR. Tento mutant má redukovanou citlivost k auxinu v prýtu i v kořenech (Muday et al., 1995). Z podobných důvodů i mutant *Arabidopsis Dwf* (*dwarf*) neprodukuje žádné LR a má agravitropní fenotyp (Mírza et al., 1984). Mutanti, kteří sice mají také redukovanou citlivost na auxin, agravitropní fenotyp, ale produkují LR (i když v menším množství než kontrolní rostliny), se označují *axr-1* a *axr-2* (*altered-auxin response*) (Boerjan et al., 1995). Redukovaný počet LR byl nalezen i u dalšího mutantu s agravitropním fenotypem, tzv. *axr4* (Hobbie a Estelle, 1995). Protipólem k těmto mutantům jsou *sur1* a *sur2* (*superroot*), kteří obsahují vyšší hladinu volného IAA. To způsobuje redukováný růst listů, neboť ty vyžadují ke svému vývoji jinou optimální koncentraci IAA (Ljung et al., 2001). Boerjan et al., 1995 popsali, že *sur1* mutant *A.thaliana* obsahuje vysoké hladiny auxinu v kořenových pletivech což způsobuje sledovaný vzrůst formování postranních kořenů.

2.2.4 Role PAT ve vývoji postranních kořenů:

Při sledování, který směr auxinu je potřebný pro iniciaci LR a který pro jejich emergenci, byl využit zejména vliv inhibitorů PAT. Reed et al., 1998 zjistili, že aplikace NPA na hranici mezi prýtem a kořenem u *Arabidopsis* redukovala počet LR a zároveň snižovala obsah IAA v kořenu. Neměli však k tomu přesná anatomická pozorování, proto z jejich

pozorování nejde jasně říci, jaká část vývoje LR byla zablokována. Casimiro et al., 2001 popsali, že NPA zapříčinila hromadění auxinu v meristému kořene a tím zablokování bazipetálního transportu od špičky kořenu k jeho bázi. Tímto došli k závěru, že pro vývoj LR u *Arabidopsis* jsou zapotřebí oba směry transportu auxinu, přičemž bazipetální reguluje iniciaci a akropetální růst primordia. Toto tvrzení potvrdili i Bhalerao et al., 2002.

Získané poznatky dovolují odpovědět na otázku, jak se mění zdroje auxinu při vývoji postranních kořenů během růstu semenáčku.

V prvních fázích vývoje semenáčku *Arabidopsis* bylo zjištěno, že je důležitý transport IAA z prýtu, který je výrazný pouze rostou-li rostliny na světle. Vysoký obsah IAA v prýtu u klíčící rostliny může pocházet z *de novo* syntézy nebo z hydrolýzy konjugátů IAA (Ljung et al., 2005; Bhalerao et al., 2002). Hlavní zdroj IAA pro kořeny jsou pak hlavně první pravé listy (většinou první dva), díky kterým se zvyšuje obsah IAA v kořenech v období pěti až sedmi dní po vyklíčení semenáčku a zároveň vyrůstají první LR (Reed et al., 1998). Dělohy k tomuto procesu přispívají jen malou měrou. Tato skutečnost byla potvrzena experimenty, ve kterých při odstranění listů v tomto období, se drasticky snížil počet LR (Ljung et al., 2001). Nicméně i zde byl pro iniciaci tvorby LR potvrzen význam bazipetálního transportu z kořenové špičky. Zjistilo se, že zdrojem auxinu je zřejmě alespoň zčásti samotná kořenová špička (Ljung et al., 2005; Bhalerao et al., 2002).

Podobně jako vrchol primárního kořene, který je zdrojem auxinu, mohou se jím stát od určitého stádia vývoje i postranní kořeny (Bhalerao et al., 2002). Laskowski et al., 1995 upozorovali, že schopnost syntézy IAA *de novo* získává primordium *Arabidopsis* již ve stádiu tří až pěti vrstev. Stále však zůstává otázkou, zda dospělé listy ukončují svůj transport IAA do kořenů (Bhalerao et al., 2002).

2.3 Závěr

Tato práce shrnuje základní poznatky o vývoji postranních kořenů a o základních mechanismech jeho regulace. Orientace v této problematice je nezbytná pro vypracování mé diplomové práce.

Cílem mé navazující diplomové práce bude sledování vlivu iontů hliníkových na vývoj struktury kořenového systému s důrazem na vývoj laterálních kořenů.

Dalším cílem mé diplomové práce bude ověření hypotézy, že příčinou poruchy vývoje LR vyvolané ionty hliníkovými (nebo alespoň jednou z hlavních příčin) je porucha transportu auxinu.

3 Experimentální část

Tato část shrnuje optimalizaci metodických přístupů a předběžné výsledky pilotních experimentů.

3.1 Vliv NAA na růst rostlin pšenice a strukturu kořenů

Cíle předběžných pokusů:

- a) vyzkoušet a modifikovat metody vhodné pro sledování parametrů kořenového systému - obrazovou analýzu pro detailní morfologickou analýzu kořenového systému, zejména pro stanovení počtu a délky postranních kořenů a délky hlavní osy, různé projasňovací metody pro určení počtu zformovaných primordií
- b) zjistit vhodné koncentrace NAA pro stimulaci růstu a zakládání postranních kořenů

3.1.1 Materiál a metody

3.1.1.1 Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál byla použita pšenice setá, *Triticum aestivum*, kultivar Zdar.

3.1.1.2 Kultivace rostlin

Obilky byly povrchově ošetřeny horkou vodou (80°C) podle Soukupové (2003). Po sterilizaci byly obilky kladeny na navlhčený filtrační papír do Petriho misek a dány do termostatu na jeden den při teplotě 27°C. Poté byly vybrány reprezentativní obilky, tj. nabobtnané obilky podobné velikosti a řádkovány na Petriho misky již bez filtračního papíru. Obilky byly smočeny vodou cca do poloviny svého objemu. Takto byly opět vloženy do termostatu na další dva dny. Po naklíčení byly opět vybrány reprezentativní naklíčené obilky s podobnou velikostí kořenového systému i nadzemní části.

Naklíčené obilky byly přeneseny do kultivačních nádob. Jako kultivační nádoby sloužila skleněná pětilitrová neprůtoková akvária se stěnami zvenku polepenými černou folií, která zabraňovala vstupu světla ze stran ke kořenům. Vstup světla shora byl zabráněn alobalem vloženým na hladinu živného roztoku. Naklíčené rostliny byly vloženy po osmi mezi dvě skleněné lišty s molitanovou výstelkou. V každé nádobě bylo umístěno 16 rostlin.

Kontrolní rostliny byly kultivovány v polovičním živném roztoku Hoagland 3 s mikroelementy (**viz tab.1**).

Tab.1: Hoaglandův živný roztok s mikroelementy

makroelementy	c (mol.l ⁻¹ .10 ⁻³)	mikroelementy	c (mol.l ⁻¹ .10 ⁻⁸)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5,1	H ₃ BO ₄	23
KNO ₃	5,1	MnCl ₂	0,72
KH ₂ PO ₄	1	ZnSO ₄	0,93
MgSO ₄ .H ₂ O	1	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,06
Fe ³⁺ citrát	0,019	CuSO ₄	0,25

Byly vyzkoušeny dvě varianty koncentrací NAA. V první variantě byla do živného roztoku aplikována NAA v koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M, obdobně jako v diplomové práci Stehlíkové (2005). Pokus byl opakován 2x. V druhé variantě byla zkoušena koncentrace $5 \cdot 10^{-8}$ M NAA.

Výsledky jsou uvedeny pouze pro první variantu ($5 \cdot 10^{-6}$ M NAA), výsledky druhé varianty ($5 \cdot 10^{-8}$ M NAA) jsou ještě vyhodnocovány.

Podle diplomové práce Stehlíkové (2005) byla zvolena doba kultivace šest dní. Hodnota pH byla každý den kontrolována pomocí pH metru Multi Line P4. Přidávky 1M HCl a 1M NaOH byla udržována mezi hodnotami 5,3 - 5,6. Kultivace probíhala v místnosti s konstantními podmínkami (fotoperioda: délka 16hodin, osvětlení $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teplota 21°C; temná perioda: délka 8hodin, teplota 15°C).

Po šesti dnech kultivace byly rostliny odebrány z akvárii, opláchnuty vodou a dále zpracovány. U nadzemní části byl spočten počet listů a změřena celková délka nadzemní části. Dále byla stanovena její čerstvá hmotnost a suchá hmotnost po usušení při 70°C. U kořenového systému byly odebrány hlavní kořeny, které byly zváženy a následně skenovány na vodní hladině pomocí upraveného scanneru HP ScanJet 4C. Tyto kořeny byly dále zpracovány analyzátozem obrazu LUCIA G (Laboratory Imaging, Praha). Ze zjištěných dat byly vybrány - délka hlavní osy, celková délka postranních kořenů a počet postranních kořenů.

Tento program umožňuje detekovat pouze postranní kořeny o minimální délce 1mm. Proto k určení celkového počtu postranních kořenů a k určení počtu založených primordií je nutné použít jiné postupy. Bylo vyzkoušeno několik postupů projasnění kořenů. Kořeny byly nejprve fixovány jeden den v 70% ethanolu a následně vloženy minimálně na tři dny do Herrova činidla (viz tab.2) podle Soukupové (2003). V této diplomové práci Soukupová (2003) pracovala pouze s kořenovými segmenty. V našem postupu byly však použity celé kořeny, proto bylo nutné pro dostatečné prosycení vložit kořeny nejprve do vývěvy a následně je zahřát v termostatu na cca 30°C. Soukupová (2003) pro následné počítání primordií užila

mikroskop. Byla vyzkoušena kombinace použití Herrova činidla (**viz tab.2**) s následným skenováním na vodní hladině, to se však nezdařilo. Díky rozdílným hodnotám indexu lomu se kořeny staly ve vodě neprůhledné. Dále byla zkoušena projasňovací metoda pomocí kyseliny mléčné. Tato metoda je pro dobré předběžné výsledky nadále zkoušena a zdokonalována.

Tab.2: Složení Herrova projasňovacího činidla

sloučenina	počet dílů
kys.mléčná	2
chloralhydrát	2
fenol	2
hřebíčkový olej*)	2
xylén	1

*) místo hřebíčkového oleje lze použít methyl salicylát

3.1.1.3 Statistické zpracování výsledků

Ke statistickému zhodnocení dat byl použit program NCSS 1998. Testování nulových hypotéz bylo provedeno dvouvýběrovým T-testem na 95% hladině významnosti. Neboť v některých případech nebylo splněno normální rozdělení, k testování nulové hypotézy byl použit Mann-Whitneyův neparametrický test. Ve všech případech byla nulová hypotéza zamítnuta.

3.1.2 Výsledky

Dosud zpracované výsledky ukazují, že NAA v použité koncentraci ($5 \cdot 10^{-6}$ M NAA - varianta A) má negativní vliv na nadzemní a zejména na podzemní části rostliny.

Při sledování nadzemní části rostliny (**viz tab.3, graf 1-4**) bylo zjištěno, že kontrolní rostliny měly vždy plně vytvořené dva listy, kdežto varianta A měla plně vyvinutý pouze jeden list. Prýty se lišily i svou délkou a hmotností (čerstvou i suchou). Prýt s největší délkou byl zaznamenán u obou opakování v kontrolní variantě, zatímco nejkratší prýt byl změřen ve variantě A.

Při sledování podzemní části rostliny (**viz tab.4, graf 5-8**) byly zjištěny průkazné rozdíly mezi kontrolou a variantou A, jak v počtu vytvořených postranních kořenů, tak i v celkové hmotnosti kořenového systému. Celková délka hlavní osy a celková délka postranních kořenů byly (u obou opakování) v kontrolní variantě výrazně vyšší než u varianty A.

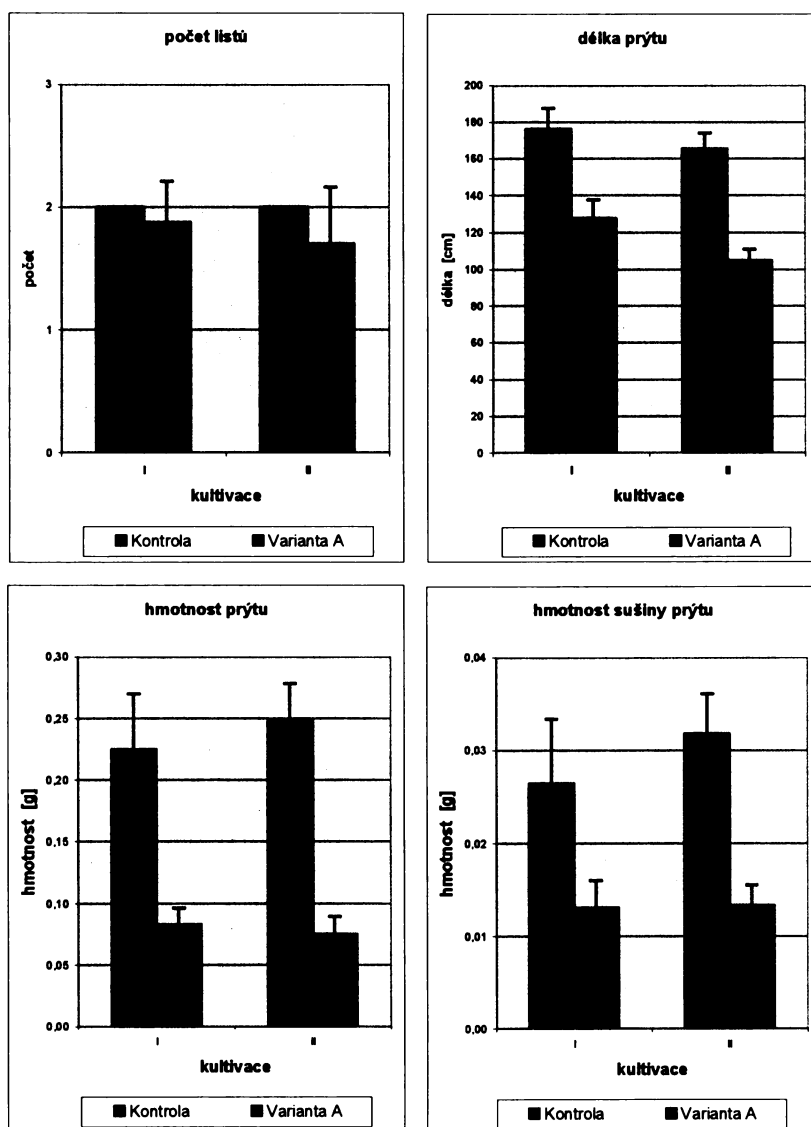
Tab. 3: Vliv NAA na sledované parametry nadzemní části rostliny

Sledovaný parametr	Kultivace	Kontrola	Varianta A	Kontrola	Varianta A
		průměrné hodnoty		směrodatné odchytky	
počet listů	I.	2,0	1,9	0,0	0,3
délka prýtu [cm]		175,9	127,7	11,4	9,7
hmotnost prýtu [g]		0,225	0,083	0,045	0,014
hmotnost sušiny prýtu [g]		0,0264	0,0131	0,0070	0,0029
počet listů	II.	2,0	1,7	0,0	0,5
délka prýtu [cm]		165,1	104,5	8,8	6,6
hmotnost prýtu [g]		0,249	0,075	0,029	0,015
hmotnost sušiny prýtu [g]		0,0318	0,0133	0,0043	0,0022

Vysvětlivky: Kontrola - varianta bez NAA

Varianta A - varianta s koncentrací NAA = $5 \cdot 10^{-6}$ M

Graf 1-4: Vliv NAA na sledované parametry nadzemní části rostliny



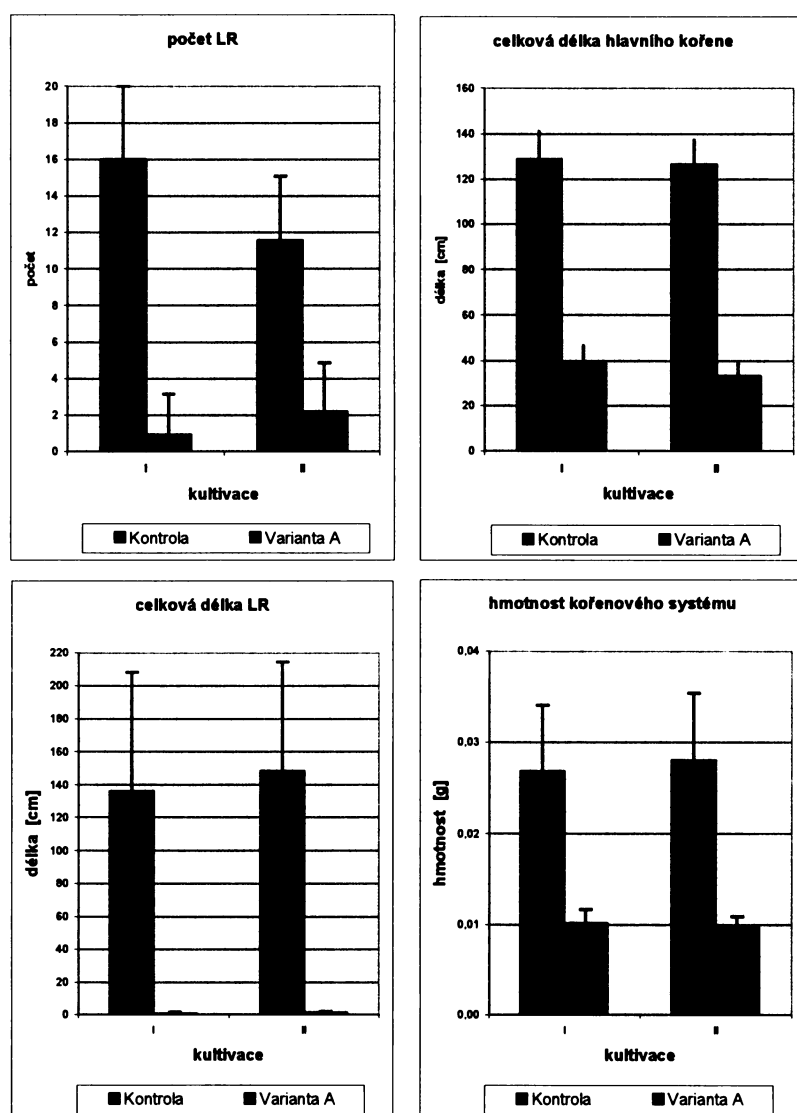
Tab. 4: Vliv NAA na sledované parametry podzemní části rostliny

Sledovaný parametr	Kultivace	Kontrola	Varianta A	Kontrola	Varianta A
		průměrné hodnoty		směrodatné odchylky	
počet LR	I.	16,0	0,9	4,0	2,2
celková délka hlavního kořene [cm]		128,78	38,62	11,98	7,80
celková délka LR [cm]		135,61	0,45	72,56	1,03
hmotnost kořenového systému [g]		0,0268	0,0101	0,0073	0,0015
počet LR	II.	11,6	2,2	3,5	2,7
celková délka hlavního kořene [cm]		126,5	33,0	10,7	5,8
celková délka LR [cm]		148,1	0,9	66,2	1,1
hmotnost kořenového systému [g]		0,0280	0,0097	0,0075	0,0012

Vysvětlivky: Kontrola - varianta bez NAA

Varianta A - varianta s koncentrací NAA = $5 \cdot 10^{-6}$ M

Graf 5-8: Vliv NAA na sledované parametry podzemní části rostliny



3.1.3 Závěr

Cílem těchto předběžných pokusů bylo:

a) vyzkoušet a modifikovat metody vhodné pro sledování parametrů kořenového systému

- byla vyzkoušena obrazová analýza v programu LUCIA G pro měření parametrů kořenového systému. Pro studium kořenového systému pšenice se tato metoda osvědčila. Lze ji použít pro měření kořenů, které jsou delší než 1mm,
- pro zjištění počtu založených primordií a postranních kořenů o délce menší než 1mm byly vyzkoušeny různé projasňovací metody s použitím Herrova činidla a kyseliny mléčné. Výsledky projasňování zatím nejsou zcela uspokojivé, proto práce na vývoji metodiky dále pokračují,

b) zjistit vhodné koncentrace NAA pro stimulaci růstu a zakládání postranních kořenů

- byla vyzkoušena koncentrace $5 \cdot 10^{-6}$ M NAA. Tato koncentrace se ukázala být příliš vysoká. Byl zjištěn její negativní vliv na růst nadzemních i podzemních orgánů. Nejsilnější inhibiční účinek byl sledován na kořenovém systému, zejména na růstu postranních kořenů,
- v současné době jsou vyhodnocovány výsledky při použití nižší koncentrace ($5 \cdot 10^{-8}$ M NAA).

4 Seznam použité literatury

Beeckman, T., Burssens, S., Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 52: 403-411.

Bell, J.K., McCully, M.E. (1970). A histological study of lateral root initiation in *Zea mays*. *Protoplasma* 70: 179-205.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.

Bhalerao, R.P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., Sandberg, G. (2002). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *The Plant Journal* 29 (3): 325-332.

Blakely, L.M., Durham, M., Evans, T.A., Blakely, R.M. (1982). Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. *Botanical Gazette* 143(3): 341-352.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Mitsuhiro, A., Palme, K., Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39-44.

Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., van Onckelen, H., van Montagu, M., Inzé, D. (1995). *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *The Plant Cell* 7: 1405-1419.

Bonnett, H.T. (1969). Cortical cell death during lateral root formation. *Journal of Cell Biology* 40: 144-159.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *TRENDS in Plant Science* 8 (4): 165-171.

Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13: 843-852.

Clowes, F.A.L. (1981). The difference between open and closed meristems. *Annals of Botany* 48: 761-767.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.

Dubrovsky, J.G., Doerner, P.W., Colón-Carmona, A., Rost, T.L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 1648-1657.

Dubrovsky, J.G., Rost, T.L. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214: 30-36.

Esau, K. (1965). *Anatomy of seed plants*. New York: John Wiley & Sons, Inc, pp.170-202.

Feldman, L.J. (1984). The development and dynamics of the root apical meristem. *American Journal of Botany* 9 (71): 1308-1314.

Friml, J. (2003). <http://kfrserver.natur.cuni.cz/cz/edu/vývoj/Part2.ppt>

Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G., Palme, K. (2002b). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 661-673.

- Friml, J., Palme, K. (2002).** Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* 49: 273-284.
- Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., Palme, K. (2002a).** Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806-809.
- Gälweiler, L., Guan, Ch., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K. (1998).** Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230.
- Himanen, K., Boucheron, El, Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inzé, D., Beeckman, T. (2002).** Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell* 14: 2339-2351.
- Hinchee, M.A., Rost, T.L. (1986).** The control of lateral root development in cultured Pea seedlings. I. The role of seedling organs and plant growth regulators. *Botanical Gazette* 147: 137-147.
- Hobbie, L., Estelle, M. (1995).** The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *The Plant Journal* 7 (2): 211-220.
- Chapman, K., Groot, E.P., Nichol, S.A., Rost, T.L. (2003).** Primary root growth and the pattern of root apical meristem organization are coupled. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 287-295.
- Charlton, W.A. (1987).** Relationship between lateral root primordia in different ranks. *Annals of Botany* 60: 455-458.
- Charlton, W.A. (1991).** Lateral root initiation. *In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U., (eds.). Plant Roots: The Hidden Half.* Marcel Dekker, New York, pp.103-128.
- Jacobs, M., Gilbert, S.F. (1983).** Basal localization of the presumptive auxin carrier in pea stem cells. *Science* 220: 1297-1300. *In: Taiz, L., Zeiger, E. (ed.). (2002). Plant physiology, 3rd ed., Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, pp.433-435.*
- Krausová, K. (2000).** Morfologické a anatomické změny kořenového systému pšenice (*Triticum aestivum* L.) cv. Zdar, vyvolané působením nízkého pH a nízkého pH a Al³⁺. Diplomová práce, Praha.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H., Sussex, I.M. (1995).** Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121: 3303-3310.
- Leyser, O. (2001).** Auxin. *Current Biology* 11 (18): 728
- Leyser, O. (2005).** Auxin distribution and plant pattern formation: How many angels can dance on the point of PIN? *Cell* 121: 819-822.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G. (2005).** Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104.
- Ljung, K., Rishikesh, Bhalerao, R.P., Sandberg, G. (2001).** Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* 28 (4): 465-474.
- Lloret, P.G., Casero, P.J., Pulgarín, A., Navascués, J. (1989).** The behaviour of two cell populations in the pericycle of *Allium cepa*, *Pisum sativum*, and *Daucus carota* during early lateral root development. *Annals of Botany* 63: 465-457.
- MacLeod, R.D., Thompson, A. (1979).** Development of lateral root primordia in *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*: rates of primordium formation and cell doubling times. *Annals of Botany* 44: 435-449.
- Malamy, J.E. (2005).** Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment* 28: 67-77.

- Malamy, J.E., Benfey, P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- Malamy, J.E., Ryan, K.S.** (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 899-909.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P.J., Bennett, M., Sandberg, G.** (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *The Plant Cell* 14: 589-597.
- Mirza, J.I., Olsen, G.M., Iversen, T.-H., Maher, E.P.** (1984). The growth and gravitropic responses of wild-type and auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 60: 516-522.
- Morris D.A., Thomas, A.G.** (1978). A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* 29 (108): 147-157
- Morris, D.A., Friml, J., Zažímalová, E.** (2004). The transport of auxins. *In: Davies, P.J., (ed.), (2004). Plant Hormones.* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp. 437-470
- Muday, G.K., Lomax, T.L., Rayle, D.L.** (1995). Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, *diageotropica*. *Planta* 195: 548-553
- Müller, A., Guan, Ch., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., Palme, K.** (1998). *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *The EMBO Journal* 17 (23): 6903-6911.
- Paciorek, T., Friml, J.** (2006). Auxin signaling. *Journal of Cell Science* 119 (7): 1199-1202.
- Paponov, I.A., Teale, W.D., Trebar, M., Blilou, I., Palme, K.** (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *TRENDS in Plant Science* 10 (4): 170-177.
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M.J.** (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *The Plant Journal* 25 (4): 399-406.
- Peterson, R.L.** (1979). Root buds in *Hieracium florentinum*: effects of nitrogen and observations on bud outgrowth. *Botanical Gazette* 140 (4): 407-413.
- Ploshchinskaya, M.E., Ivanov, V.B., Salmin, S.A., Bystrova, E.I.** (2002). Analysis of possible mechanisms of regulation of root branching. *Žurnal obščej biologii (Journal of general biology)* 63: 68-74 [in Russian]
- Rashotte, A., Brady, S., Reed, R., Ante, S., Muday, G.** (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122: 481-490.
- Reed, R.C., Brady, S.R., Muday, G.K.** (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118: 1369-1378.
- 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. *Plant Cell* 9: 745-757.
- Soukupová, L.** (2003). Vliv hliníku při nízkém pH na kořenový systém pšenice. Diplomová práce, Praha.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Wilemsen, V., Terlouw, M.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120: 2475-2487. *In: Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H., Sussex, I.M.* (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121: 3303-3310.

Soukup, A., Votrubová, O., Čížková, H. (2002). Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* 153: 277-287.

Stehlíková, B. (2005). Vliv pH na růst rostlin a strukturu kořenů kukuřice seté *Zea mays* L., Diplomová práce, Praha.

Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development* 15: 2648-2653.

Taiz, L., Zeiger, E. (eds.). (2002). *Plant physiology*, 3rd ed., Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, pp.423-460.

Van Tieghem, P., Douliot, H. (1888). Recherches comparatives sur l'origine des membres endogènes dans les plantes vasculaires. *Ann. Sci. Bot. Ser. 7* (8): 1-660. *In:* Bell, J.K., McCully, M.E. (1970). A histological study of lateral root initiation in *Zea mays*. *Protoplasma* 70: 179-205.

Von Guttenberg, H. (1968). Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. *In:* *Handbuch der Pflanzenanatomie*, 2nd ed., Vol.8, Part 5, Borntraeger, Berlin. pp. 41-84

Wightman, F., Thimann, K.V. (1980). Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. I. Sources of primordia-inducing substances in the primary root of pea seedlings. *Physiologia Plantarum* 49: 13-20.