

## GENETYCZNE I MOLEKULARNE PODSTAWY ROZWOJU WŁOŚNIKÓW U *ARABIDOPSIS THALIANA*

### THE GENETIC AND MOLECULAR BASIS OF ROOT HAIR DEVELOPMENT IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Agnieszka JANIĄK, Iwona SZAREJKO

Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski, Katowice

*Streszczenie:* Włosniki są wypustkami komórek epidermy korzenia, mają cylindryczny kształt i charakteryzują się wzrostem szczytowym polegającym na odkładaniu nowego materiału budującego błonę i ścianę komórkową w szczycie rosnącej wypustki. Poza zwiększaniem powierzchni chłonnej, pobieraniem wody i soli mineralnych oraz zakotwiczeniem rośliny w podłożu, włosniki biorą udział w tworzeniu interakcji z mikroorganizmami glebowymi, mogą być również miejscem syntezy i wydzielania bioherbicydów. Rozwój włosników jest procesem złożonym, w który zaangażowanych jest wiele białek, enzymów i struktur komórkowych. Można w nim wyróżnić kilka etapów: tworzenie wzoru ryzodermi, inicjację wzrostu poprzez utworzenie bulwki, przejście do wzrostu szczytowego oraz sam wzrost. Jak do tej pory opisano istnienie kilkudziesięciu genów biorących udział w rozwoju włosników, przy czym około 40 z nich zostało scharakteryzowanych pod względem molekularnym. Należą do nich geny kodujące czynniki transkrypcyjne, elementy budulcowe komórki, głównie ściany komórkowej, szereg enzymów z grupy kinaz oraz GTPazy, zaangażowane w przekazywanie sygnałów komórkowych, sterowanie rearanżacjami cytoszkieletu czy kierowanie transportem pęcherzykowym. Ważną rolę w tworzeniu włosników mają również hormony, głównie etylen oraz auksyny. Ze względu na łatwość obserwacji i nierzadko uniwersalność procesów biochemicznych prowadzących do rozwoju włosników, mogą one stanowić doskonały model w studiowaniu różnicowania się komórek. Niniejsza praca stanowi wyczerpujący przegląd dotychczasowej wiedzy na temat genetycznej i molekularnej kontroli rozwoju włosników u modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana*.

*Słowa kluczowe:* włosniki, *Arabidopsis thaliana*, różnicowanie komórek, wzrost szczytowy.

*Summary:* Root hairs are cylindrical in shape outgrowths of root epidermis. They are characterized by the tip growth which relies on the deposition of new components of cell membrane and cell wall at the tip of the growing hair. The main role of root hairs is to extend the root surface, uptake of water and mineral soils. They are responsible for building interactions with soil microorganisms, and in some species, they synthesize and secrete bioherbicides. The development of root hairs is a complex process that involves many proteins, enzymes and cellular structures. It can be divided into several phases: formation of rhizodermis pattern, initiation of root hair development by bulge formation, transition to the tip growth and the tip growth itself. Up to date, several dozens of genes involved in root hair formation have been described and about 40 of them were characterized at the molecular level. Among them, there are genes

encoding transcription factors, cell wall components and variety of enzymes, including kinases family and GTPases. Many of proteins are involved in cell signaling, cytoskeletal dynamics or vesicular trafficking. Plant hormones, mainly ethylene and auxin play also an important role in root hair development. Although the type of root hair growth is rather distinctive among the plant cells, many biochemical pathways that lead to their development are universal, and because of the relative ease of their observation, root hairs can serve as a good model of plant cell differentiation. The paper presents a comprehensive review on the genetic and molecular control of root hair development in a model plant *Arabidopsis thaliana*.

*Key words:* root hairs, *Arabidopsis thaliana*, cell differentiation, tip growth.

## CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK EPIDERMY KORZENIA

Epiderma korzenia składa się z żywych, przylegających do siebie, cienkościennych komórek. U większości roślin okrytonasiennych wszystkie komórki epidermy opuszczające strefę merystematyczną mają zdolność wytwarzania włosników. Ostatecznie jednak, włosniki powstają tylko z części komórek skórki nazywanych trichoblastami, w przeciwieństwie do atrichoblastów niewytwarzających włosników. Początkowo włosnik stanowi uwypuklenie komórki, swego rodzaju bulwkę, do której przechodzi jądro. Pierwsze fazy tworzenia bulwki są powolne i przypominają zwykły wzrost wydłużeniowy, po którym następuje gwałtowne przyspieszenie tempa wzrostu, osiągające u *A. thaliana* około 1  $\mu\text{m}/\text{min}$  [15]. Ostatecznie, komórka epidermy z dojrzałym włosnikiem ulega silnej wakuolizacji.

U roślin naczyniowych można wyróżnić trzy typy wzorów, w jakie ułożone są komórki tricho- i atrichoblastów. W typie I wszystkie komórki ryzodermi mają zdolność tworzenia włosników, choć nie zawsze tę możliwość realizują. Jediną różnicą morfologiczną między tricho- i atrichoblastami jest obecność lub brak włosnika. W typie II, komórki ryzodermi w strefie merystematycznej przechodzą niesymetryczny podział, w wyniku którego powstaje mniejsza komórka rozwijająca się dalej w komórkę włosnikową oraz komórka większa różnicująca się w atrichoblast [16]. Z kolei w typie III, komórki włosnikowe pojawiają się w rzędach wzdłuż epidermy korzenia, oddzielonych od siebie jednym lub kilkoma rzędami komórek bezwłosnikowych. U gatunków charakteryzujących się takim wzorem komórek ryzodermi, do których należy także *A. thaliana*, trichoblasty są nieco mniejsze i mają gęstszą cytoplazmę niż atrichoblasty [18].

## GENETYCZNE I MOLEKULARNE PODSTAWY ROZWOJU WŁOŚNIKÓW

### Wzór epidermy i rozmieszczenie włosników

Pierwszym etapem morfogenezy włosników jest różnicowanie się epidermy korzenia na komórki, które staną się trichoblastami, i komórki, które nie wytworzą włosników. U *A. thaliana* przyszły los komórek epidermy zależy od ich pozycji w stosunku do komórek warstwy kory. Zaobserwowano, że komórki skórki, które leżą nad antyklinalną ścianą komórkową łączącą dwie komórki kory będą się różnicowały w kierunku włosników,

natomiast te, rozwijające się nad peryklinalną ścianą pojedynczej komórki kory staną się atrichoblastami [17]. Informacja na temat pozycji poszczególnych komórek jest prawdopodobnie zdeterminowana już we wczesnej fazie rozwoju zarodka, w stadium torpedy i utrzymywana przez cały okres rozwoju korzenia [4]. Komórki tricho- i atrichoblastów mogą być rozróżnione już w strefie merystematycznej, przed wytworzeniem włóśników. Atrichoblasty mają rzadszą cytoplazmę, dużą wakuolę i charakteryzują się szybkim wzrostem elongacyjnym, przeciwnie do komórek włóśnikowych o gęstej cytoplazmie, niewielkiej wakuoli i wolniejszym wzroście.

Większość genów odpowiedzialnych za formowanie wzoru epidermy korzenia ma działanie plejotropowe i jest związana z regulacją wielu innych procesów rozwojowych. Jednym z nich jest gen *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* [22], kodujący białko o powtórzeniach typu WD40 [70]. Powtórzenia tego typu są charakterystyczne dla czynników biorących udział w tworzeniu interakcji białko-białko, przy czym nie mają one charakteru enzymatycznego [51]. Białka te są zaangażowane w tworzenie kompleksów z czynnikami transkrypcyjnymi mającymi domeny typu MYB oraz bHLH (ang. *basic Helix-Loop-Helix*), które z kolei biorą udział w kontroli różnicowania się komórek [5]. Gen *TTG1* uczestniczy w wielu procesach, między innymi w rozwoju włósków na liściach, włóśników, jak również produkcji antocyjanów [35]. Wydaje się więc, że jest on odpowiedzialny za kontrolę różnych szlaków biochemicznych związanych z rozwojem komórek epidermy.

Ukierunkowanie rozwoju komórek epidermy korzenia zależy przede wszystkim od genu *GLABRA2 (GL2)*, kodującego czynnik transkrypcyjny z homeodomeną, który negatywnie reguluje działanie jednego z czynników transdukcji sygnałów komórkowych, fosfolipazy D $\zeta$ 1, biorącej udział w indukcji rozwoju włóśników [45]. Obecność genu *GL2* w komórkach epidermy powoduje więc wytworzenie atrichoblastów. Aktywność genu *GL2* jest z kolei kontrolowana przez inne czynniki transkrypcyjne. Wykazano, że najwcześniej działającymi czynnikami są białka typu MYB kodowane przez geny *WEREWOLF (WER)* [37] oraz *CAPRICE (CPC)* [69].

Mutacje zarówno w genie *GL2*, jak i *WER* powodują wytwarzanie włóśników przez wszystkie komórki ryzodermy, co dowodzi, że stanowią one o negatywnej regulacji powstawania trichoblastów. Podobną rolę pełnią geny *GLABRA3 (GL3)* oraz *ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)* [5]. Mutacje w tych genach prowadzą do zmniejszenia ilości atrichoblastów, natomiast u podwójnych mutantów *gl3 egl3* niemal wszystkie komórki rozwijają włóśniki.

Z kolei mutacje w genie *CPC* prowadzą do powstania roślin bezwłóśnikowych lub o rzadkich włóśnikach, a więc gen *CPC* jest pozytywnym regulatorem rozwoju włóśników. Czynnik transkrypcyjny kodowany przez gen *CPC* nie ma domeny aktywującej, co sugeruje, że działa on prawdopodobnie jako represor transkrypcji, blokując ekspresję genu *GL2* odpowiedzialnego za powstawanie atrichoblastów [33]. Innym represorem działającym podobnie do *CPC* jest kolejny czynnik typu MYB kodowany przez gen *ENHANCER OF TRIPTICHON AND CAPRICE1 (ETC1)* [33].

Ponieważ zidentyfikowane do tej pory geny wzoru ryzodermy, z wyjątkiem genu *TTG1*, kodują czynniki transkrypcyjne, stworzono model opisujący zależności między nimi. Wykazano, że czynniki *GL3* i *EGL3* mogą tworzyć kompleks z białkiem kodowanym

przez *TTG1* lub *WER*, działający jako aktywator transkrypcji. Z kolei czynnik *CPC* hamuje wiązanie *WER* do czynnika *GL3* prowadząc do powstania nieaktywnego kompleksu, a w rezultacie – represji transkrypcji [5]. Wydaje się więc, że o kierunku rozwoju komórek epidermy koprzenia decyduje stosunek ilości produktów genów *WER* i *CPC*, które nie tylko regulują działanie genu *GL2*, ale także nawzajem modulują poziom ekspresji kodujących je genów. Taka wzajemna, dynamiczna modulacja ekspresji jest również opisywana jako system aktywacji–inhibicji, będący rodzajem systemu reakcji–dyfuzji Turinga [48, 65]. System ten zakłada, że w trakcie tworzenia wzoru podczas morfogenezy, czynniki aktywujące powstawanie komórek określonego typu wzmacniają własną ekspresję na zasadzie pozytywnego sprzężenia zwrotnego, przy jednoczesnej aktywacji ekspresji inhibitorów. Z kolei inhibitory przemieszczają się do sąsiadujących komórek, gdzie blokują ekspresję aktywatorów, co prowadzi do utworzenia określonego wzoru komórek. Wydaje się, że ekspresja genów *WER*, *CPC*, *GL3* i *EGL3* może podlegać takiej właśnie regulacji, czego dowodem mogą być badania przeprowadzone przez Bernhardt i współpracowników [5] nad wzajemnymi zależnościami między wymienionymi genami oraz Kuraty i innych [36] nad przemieszczaniem się białka *CPC* z tricho- do atrichoblastów.

Chociaż geny *WER*, *TTG1*, *GL2* i *CPC* pełnią podstawową rolę w determinacji wzoru ryzodermi, nie są to jedyne czynniki wpływające na rozmieszczenie włosników. Mutanty *ectopic root hair1 (erh1)*, *pom-pom1 (pom1)* oraz *ectopic root hair3 (erh3)* [24, 61] wytwarzają znacznie więcej włosników niż forma dzika, co sugeruje ich rolę w prawidłowym określaniu wzoru ryzodermi oraz w rozwoju komórek bezwłosnikowych. Dodatkowo, u mutantu *erh3* może dochodzić do zmiany zależności między pozycją komórki a jej losem: komórki w pozycji trichoblastów są pozbawione włosników, a komórki w pozycji atrichoblastów wytwarzają wypustki. Gen *ERH3* koduje podjednostkę katalityczną kataniny p60, której aktywność wiąże się z dynamiką mikrotubul oraz powstawaniem ściany komórkowej. U formy dzikiej, gen *ERH3* ulega ekspresji w komórkach kory i endodermi, podczas gdy u mutantów *erh3*, ekspresja pojawia się dodatkowo w komórkach epidermy, co prowadzi do zaburzeń w powstawaniu ścian komórkowych. Wydaje się, że rearanżacje mikrotubul zachodzące za pośrednictwem kataniny p60, mogą wpływać na prawidłowe tworzenie ściany komórkowej, a w konsekwencji utrwalanie wskazówek co do pozycji komórek względem siebie i przenoszenie informacji o tożsamości obu typów komórek epidermy [73].

### Inicjacja włosników

Gdy los komórek epidermy korzenia zostanie już określony, muszą zajść w nich dalsze zmiany, aby wytworzyć włosniki. Pierwszym etapem w tym procesie jest rozluźnienie ściany komórkowej i powstanie uwypuklenia, swego rodzaju bulwki. U wielu gatunków roślin, w tym u *Arabidopsis*, włosniki powstają w apikalnej części komórki włosnikowej. Zmiany fizjologiczne, jakie poprzedzają wytworzenie włosnika, rozpoczynają się od pojawienia się w miejscu inicjacji białka *Rop2*, niewielkiej GTPazy łączącej się z błoną komórkową i kontrolującej tworzenie się gradientu wapniowego oraz akumulację aktyny F w powstającym szczycie włosnika [27, 43, 56, 78]. Z chwilą pojawienia się białka *Rop* ściana komórkowa wybrzusza się, czemu towarzyszy spadek poziomu pH,

spowodowany uaktywnieniem pompy protonowej zależnej od ATP [7] lub jej lokalnymi zmianami biochemicznymi, które mogą wiązać się z działaniem enzymów z grupy metyloesteraz pektynowych – PME (ang. *Pectin Methylesterases*) [10]. Enzymy te katalizują deestryfikację grupy metoksylowej w łańcuchach kwasu poligalakturonowego, prowadząc do powstawania ujemnie naładowanych grup karboksylowych z jednoczesnym uwolnieniem metanolu i protonów, co skutkuje lokalnym zakwaszeniem ściany komórkowej. Z kolei spadek pH aktywuje ekspansyny – białka uczestniczące w rozluźnianiu ściany komórkowej [1]. Ekspansyny są dużą rodziną białek, występujących powszechnie u wielu gatunków roślin, zarówno okryto-, jak i nagonasiennych i odgrywają rolę we wzroście wielu typów komórek [39]. Co ciekawe, regulacja ekspresji ekspansyn specyficznych dla komórek włóśnikowych przebiega podobnie nawet u gatunków różniących się wzorem rozmieszczenia włóśników. Podobieństwo to jest wynikiem występowania konserwatywnego elementu RHE (ang. *Root Hair-specific cis-Element*) w promotorze tych genów [32]. Ekspansyny nie wykazują właściwości hydrolitycznych, lecz najprawdopodobniej przerywają wiązania niekowalencyjne pomiędzy włóknami hemicelulozowymi, albo na powierzchni mikrofibryli celulozowych, lub też w głębi matryks pomiędzy mikrofibrylami. Powoduje to lokalne rozluźnienie asocjacji między polisacharydami, a odśrodkowo działające parcie protoplastu na ścianę umożliwia ich rozsuniecie, co sprawia, że stają się one bardziej dostępne dla hydrolaz [14]. Jednym z enzymów katalizujących rozpad i ponowne łączenie łańcuchów hemicelulozowych, w szczególności łańcuchów ksyloglukanu, jest endotransglikozylaza ksyloglukanowa (XAT) [64]. Enzym ten pojawia się jeszcze przed powstaniem bulwki, precyzyjnie w miejscu inicjacji, a jego ekspresja utrzymuje się przez cały czas wzrostu włóśnika [68]. Kiedy ściana komórkowa ulegnie rozluźnieniu, w miejscu inicjacji następuje kondensacja retikulum endoplazmatycznego oraz aktyny [1].

Mutacje w genach kontrolujących proces inicjacji włóśników dają podobne efekty fenotypowe jak mutacje w genach odpowiedzialnych za tworzenie wzoru epidermy korzenia, dlatego też trudno precyzyjnie rozróżnić te dwa typy zmian. Przyjmuje się, że z chwilą pojawienia się różnic cytologicznych między komórkami tricho- i atrichoblastów, wzór komórek epidermy jest już ustalony, a za dalsze zaburzenia odpowiadają mutacje w genach biorących udział w inicjacji włóśników.

Grupą genów odpowiedzialnych za końcowe etapy determinacji wzoru komórek ryzodermi oraz za proces inicjacji włóśników są geny *ROOT HAIRLESS (RHL)*. Mutanty *rhl1*, *rhl2* i *rhl3* charakteryzują się prawie całkowitym brakiem włóśników oraz nieprawidłowym różnicowaniem się komórek epidermy w zależności od ich pozycji w stosunku do komórek kory pierwotnej [61]. Ponadto, mutacja w genie *RHL1* odpowiada za zaburzenia w powstawaniu wzoru epidermy liścia i wzrostu wydłużeniowego komórek. Rośliny mutanta *rhl1* zamierają w stadium siewki. Produktem genu *RHL1* jest najprawdopodobniej jeden z elementów kompleksu topoizomerazy IV, enzymu niezbędnego w procesie endoreduplikacji związanej ze zwiększaniem rozmiarów komórek. Ponadto, białko RHL1 prawdopodobnie tworzy funkcjonalny kompleks z białkami RHL2 i RHL3, wydaje się więc, że wymienione geny odpowiadają nie tylko za tworzenie włóśników, lecz przede wszystkim kontrolują prawidłowy wzrost rośliny [63].

Rozwój włóśników, w tym inicjacja ich powstawania, zależy również od działania czynników hormonalnych. Główną rolę w tym procesie odgrywają auksyny i etylen,

które wspomagają różnicowanie się komórek włosnikowych. Dowodem na rolę tych czynników w tworzeniu włosników są doświadczenia z zastosowaniem inhibitorów biosyntezy etylenu, które blokują powstawanie włosników [40]. Ponadto, mutacje w genie *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)*, który koduje kinazę białkową z rodziny Raf, biorącą udział w negatywnej regulacji ścieżki transdukcji sygnału etylenu [31], powodują powstawanie włosników w tych komórkach, które ich zazwyczaj nie wykształcają [17]. Dodatkowych dowodów na rolę etylenu w indukcji włosników, a w szczególności w determinacji miejsca ich powstawania w komórce włosnikowej, dostarczają mutanty *ethylene receptor1 (etr1)* oraz *ethylene overproducer1 (eto1)*. Mutant *etr1* nie jest zdolny do pobierania etylenu, ze względu na uszkodzony receptor tego hormonu, a włosniki pojawiają się u niego bliżej bazalnego końca komórki włosnikowej. Z kolei mutant *eto1* produkuje więcej etylenu niż forma dzika, a włosniki pojawiają się znacznie bliżej apikalnego końca komórki [41].

Podobnie, mutanty *Arabidopsis* niewrażliwe na auksyny, *dwarf (dwf)*, *auxin resistant2 (axr2)* oraz *auxin resistant3 (axr3)* charakteryzują się zredukowaną liczbą włosników oraz zmianą miejsca ich inicjacji w komórce [34, 42, 75]. Gen *AXR2* koduje białko AXR2/IAA7, które przypuszczalnie jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów odpowiedzi na auksyny, co świadczy o roli tych hormonów w polaryzacji komórki włosnikowej oraz inicjacji rozwoju włosnika [44]. Ponadto, mutacje w genie *AXR2* powodują zmniejszenie różnic cytologicznych pomiędzy komórkami włosnikowymi i bezwłosnikowymi, co sugeruje ich udział we wczesnym ustalaniu wzoru epidermy. Niemniej jednak ścieżka etylenowa i auksynowa nie odgrywa roli w regulacji ekspresji genów *TTG1* i *GL2*, działa później lub niezależnie od wymienionych genów, dlatego też uważa się, że auksyny i etylen nie definiują losu nowo tworzących się komórek epidermy tak, jak ma to miejsce w przypadku *TTG1* i *GL2*, lecz modulują ostateczny wzór rozmieszczenia włosników [41]. Mogą też sterować rozwojem włosników i ich zagęszczeniem w odpowiedzi na zmiany środowiskowe, takie jak wilgotność lub dostępność soli mineralnych [59].

Innym genem związanym z inicjacją włosników jest gen *ROOT HAIR DEFECTIVE6 (RHD6)*. Mutacja *rh6* warunkuje powstawanie znacznie rzadszych włosników niż u formy dzikiej, przesunięcie miejsca inicjacji włosnika ku bazalnej części komórki, a także powstawanie wielu włosników w jednej komórce ryzodermy. Zmiany obserwowane u tego mutantu sugerują, że gen *RHD6* odpowiada zarówno za sam mechanizm inicjacji włosnika, jak i wybór miejsca jego tworzenia. Ponadto, u roślin mutantu *rh6* rosnących na pożywce z dodatkiem auksyn (IAA) lub prekursorów etylenu (ACC), następuje supresja fenotypu i tworzenie włosników o normalnej gęstości, co dodatkowo podkreśla rolę tych czynników w procesie inicjacji i wzrostu włosników oraz dowodzi, że gen *RHD6* koduje jeden z elementów ścieżki przekazywania sygnałów hormonalnych [12, 15, 40].

#### Prawidłowe tworzenie zawiązków włosników

Kolejna grupa genów kontroluje u *A. thaliana* wielkość i liczbę bulwek powstających w pojedynczym trichoblastie. Jak wspomniano, wyrzuczenie ściany komórkowej tworzy się

poprzez jej rozluźnienie. U roślin *A. thaliana* typu dzikiego, ilość rozluźnianej ściany i wielkość powstającej bulwki jest zawsze jednakowa, a średnica bulwki wynosi około 22  $\mu\text{m}$  [47]. Za kontrolę ilości rozluźnianej ściany komórkowej odpowiadają geny *ROOT HAIR DEFECTIVE 1* (*RHD1*) [60] oraz *TIP1* [55]. Rośliny *rhdl* wytwarzają wybrzuszenie, obejmujące niemal całą powierzchnię komórki włosnikowej, niemniej jednak włosniki u tego mutantu osiągają normalną długość. Z kolei u mutantu *tip1* średnica bulwki jest powiększona o jedną trzecią, włosniki są krótkie i mają tendencję do rozgałęziania się. Dodatkowo, w jednym trichoblaście może tworzyć się od dwóch do czterech włosników, a wysokość roślin jest nieco mniejsza niż w typie dzikim, co jest spowodowane redukcją wielkości komórek. Gen *TIP1* odpowiada także za wzrost szczytowy ziaren pyłku, co razem sugeruje, że kontroluje on inicjację i utrzymanie zarówno wzrostu szczytowego, jak i szeroko rozumianego wzrostu wydłużeniowego komórek.

Liczba zawiązków włosników powstających w jednej komórce zależy między innymi od aktywności genu *SUPERCENTIPEDE 1* (*SCN1*). Rośliny pozbawione jego aktywności wytwarzają do pięciu wybrzuszeń, pojawiających się jedno na drugim [23]. Podobnie rośliny mutantu *tiny root hair1* (*trh1*) mogą wytwarzać wiele miejsc inicjacji włosników [52]. Gen *TRH1* koduje transporter potasu należący do rodziny AtKT/AtKUP/HAK, zlokalizowany najprawdopodobniej w błonie retikulum endoplazmatycznego lub tonoplacie. Mutacje w tym genie powodują zatrzymanie rozwoju włosnika w stadium inicjalnym, tuż po wykształceniu bulwki, a więc gen ten uczestniczy między innymi w przejściu włosnika do wzrostu szczytowego. Tworzenie wielu miejsc inicjacji świadczyć może o tym, że produkt genu *TRH1* jest odpowiedzialny także za inhibicję wzrostu dodatkowych włosników w pojedynczym trichoblaście.

Jak zaznaczono wcześniej, ważną rolę w inicjacji rozwoju włosnika odgrywa GTPaza Rop2. Białko to pojawia się w miejscu inicjacji jeszcze przed rozpoczęciem formowania wybruszenia i pozostaje na szczycie włosnika aż do zakończenia jego wzrostu. Dowodu na udział białek Rop2 w tym procesie dostarczyły doświadczenia z transgenicznymi liniami *A. thaliana* wykazującymi jego nadekspresję, co prowadziło do wykształcania wielu miejsc inicjacji włosników [28]. Stwierdzono także, że precyzyjne pojawianie się białka Rop2 w miejscu inicjacji włosnika jest kontrolowane przez czynnik ADP-RIBOSYLATION FACTOR1 (ARF1), zlokalizowany w aparacie Golgiego i endosomach. Czynnikiem ten jest związany z ustanawianiem apikalno-bazalnej polarnośći w komórkach epidermy, co wiąże się między innymi z tworzeniem miejsc inicjacji włosników oraz ich wzrostem szczytowym. Czynnikiem ARF1 jest ponadto odpowiedzialny za kontrolę transportu pęcherzykowego i sortowanie białek z siateczki endoplazmatycznej do aparatu Golgiego, a stąd do błony komórkowej oraz kierowanie odzyskiwaniem nadmiaru błony komórkowej w drodze endocytozy [62, 77].

### Szczytowy wzrost włosników

Od momentu wytworzenia zawiązka włosnika w postaci wybruszenia ściany komórkowej, dalszy jego rozwój jest realizowany poprzez wzrost szczytowy, podczas którego nowy materiał budujący ścianę komórkową jest precyzyjnie umiejscawiany w szczycie wypustki. Precyzyjny transport hemicelulozy, pektyn i białek budujących ścianę

komórkową jest możliwy dzięki wysokiemu uorganizowaniu cytoplazmy w rosnącym włośniku. W jego wierzchołku znajdują się pęcherzyki zawierające polisacharydy oraz białka budujące ścianę komórkową, produkowane przez gładką i szorstką siateczkę endoplazmatyczną oraz diktiosomy aparatu Golgiego, obecne w szczycie włośnika w wielu kopiach. W czasie wzrostu włośnika jądro komórkowe przemieszcza się do powstającej wypustki, a w jej szczycie dochodzi do kondensacji mikrofilamentów aktynowych [1, 29]. Tworząca się sieć mikrofilamentów jest najprawdopodobniej niezbędna do kierowania transportem pęcherzyków błonowych mających ulec fuzji z błoną komórkową. Skutkiem działania takiego aparatu wydzielniczego jest jednak dostarczanie do szczytu wypustki większej ilości błony komórkowej niż jest to wymagane do jej wzrostu. Dlatego też jej ilość jest wyrównywana poprzez endocytozę. Ruch pęcherzyków i obecność mikrofilamentów aktynowych w szczycie włośnika tworzy pewnego rodzaju dynamiczną sieć, dającą się wyróżnić jako odrębny kompartment komórki [13, 57]. Z kolei inny element cytoszkieletu – mikrotubule, jest konieczny do utrzymywania prawidłowego kierunku wzrostu włośnika [8]. Do rozwoju włośnika są także niezbędne jony wapnia, o czym świadczy wysokie ich stężenie w powstającej wypustce [76]. Jednym z zadań jonów wapnia jest regulacja transportu pęcherzykowego oraz rearanżacji cytoszkieletu w szczytowo rosnących komórkach [25]. Jony te są najprawdopodobniej transportowane spoza komórki, poprzez kanały wapniowe aktywowane hiperpolaryzacją błony. O roli kanałów wapniowych we wzroście włośnika świadczy ich malejąca aktywność wraz z odległością od szczytu wypustki [66]. Utrzymywanie wzrostu komórki, w tym także włośnika, jest możliwe dzięki właściwemu ciśnieniu osmotycznemu. Aby zapewnić odpowiedni turgor, w komórce następuje gromadzenie aktywnych osmotycznie jonów, przede wszystkim potasu i chloru [38].

Przejście komórki włośnikowej do wzrostu szczytowego pociąga za sobą wiele zmian fizjologicznych i wymaga aktywności szeregu genów. U *A. thaliana* jednym z nich jest gen *ROOT HAIR DEFECTIVE2 (RHD2)*. U mutantów *rhd2* rozwój włośników zatrzymuje się w stadium inicjalnym po wykształceniu bulwki [60]. Wykazano, że u roślin tych nie tworzy się gradient jonów wapniowych konieczny do wzrostu szczytowego [76], za co jest odpowiedzialna mutacja w genie oksydazy NADPH/RHD2 wytwarzającej reaktywne cząsteczki tlenu (ROS) [20]. Aktywność oksydazy NADPH/RHD2 może być z kolei kontrolowana przez niewielką GTPazę Rop, konieczną do wzrostu włośnika przez cały czas jego powstawania.

Kolejne geny niezbędne do zapoczątkowania wzrostu szczytowego to *SHAVEN1 (SHV1)*, *SHV2* oraz *SHV3* [47]. Włośniki u tych mutantów rzadko przekraczają długość 40  $\mu\text{m}$ , podczas gdy u formy dzikiej długość ta wynosi około 900  $\mu\text{m}$ . Rola genów *SHV* w przejściu od stadium inicjacji do wzrostu szczytowego została dodatkowo potwierdzona poprzez analizy genetyczne, które wykazały, że geny te są epistatyczne w stosunku do kilku innych loci kontrolujących wzrost włośnika, niemniej jednak, do tej pory nie poznano molekularnego podłoża zmian obserwowanych u mutantów *shaven*.

Inne geny konieczne do zainicjowania wzrostu szczytowego są związane z syntezą składników ściany komórkowej. Jednym z nich jest gen *KOJAK (KJK)* [19]. U mutantów *kjk*, w wyniku rozluźniania ściany komórkowej pojawia się zawiązek włośnika, który jednak nie przechodzi do normalnego wzrostu szczytowego, a powstała bulwka



powiększa się sferycznie i często pęka, powodując wydostanie się protoplastu na zewnątrz komórki, co prowadzi do jej śmierci. Gen *KJK* koduje enzym AtCSLD3 powstający w retikulum endoplazmatycznym i syntetyzujący komponenty ściany komórkowej. Przypomina on syntazę celulozową, przy czym celuloza powstaje w błonie komórkowej, dlatego też enzym AtCSLD3 bierze raczej udział w syntezie innych polisacharydów, takich jak beta-ksylan, mannan czy ksyloglukan. Brak tych składników w ścianie komórkowej powoduje jej znaczne osłabienie i w rezultacie brak wytrzymałości na ciśnienie osmotyczne w rosnącej komórce włośnikowej.

W budowę struktury ściany komórkowej, poza polisacharydami, zaangażowane są trzy główne typy białek strukturalnych: białka bogate w prolinę (PRP), białka bogate w glicynę (GRP) oraz glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę (HRGP), nazywane także ekstensynami [11]. Scharakteryzowano między innymi bogate w prolinę białko AtPRP3, którego ekspresja pojawia się we wczesnych etapach rozwoju włośników, w momencie tworzenia wybrzuszenia ściany komórkowej. Białko to nie powstaje u bezwłośnikowego mutantu *rhd6*, natomiast jego ekspresja jest wzmocniona u mutantów *ttg1* oraz *gl2* wytwarzających włośniki w każdej komórce epidermy, co oznacza, że jego obecność jest ściśle związana z powstającą wypustką. Występowanie AtPRP3 jest ograniczone tylko do włośników, a jego ekspresja jest kontrolowana przez ścieżkę transdukcji sygnału, w której pośredniczą etylen i auksyny [6]. Niemniej jednak, nie zidentyfikowano do tej pory mutantów, które utraciłyby zdolność do syntezy tego białka, dlatego też trudno ocenić jego specyficzną rolę w budowaniu ściany komórkowej powstającego włośnika.

Zidentyfikowano natomiast inną mutację zaburzającą wytwarzanie ściany komórkowej, a dotyczącą genu *LRR/EXTENSINI (LRX1)* [3]. Włośniki u mutantu *lrx1* są krótsze niż u formy wyjściowej, tworzą ponadto uwypuklenia i rozgałęzienia wzdłuż rosnącej wypustki włośnika. Taki fenotyp, podobnie jak u mutantu *kjk*, świadczy o osłabieniu struktury ściany komórkowej. Gen *LRX1* koduje złożone białko zawierające w swojej strukturze domenę ekstensyny oraz domenę bogatą w leucyny. Obecność domeny ekstensynowej zapewnia transport tego białka do ściany komórkowej w szczytowo rosnącym włośniku i ściśle z nią związanie. Natomiast domena leucynowa jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za polaryzację i stabilizację wzrostu włośnika, poprzez tworzenie fizycznych połączeń między ścianą a błoną komórkową. Tak więc, białko LRX1 jest jednym ze składników ściany komórkowej, związanym z regulacją wzrostu komórki.

Cytoszkielecik, a przede wszystkim mikrofilamenty aktynowe oraz reorganizacje, jakim podlegają podczas rozwoju włośnika sprawiają, że stanowią one jeden z centralnych elementów decydujących o jego prawidłowym rozwoju. Dowiedziono, że dynamika tworzenia cytoszkieletku aktynowego znajduje się pod kontrolą ścieżki transdukcji sygnału pobudzanej przez reaktywne cząsteczki tlenu (ROS), jony wapnia oraz auksyny i etylen. Transdukcja ta obejmuje także kinazy aktywowane przez mitogen – MAPKs (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*) [56]. Enzymy te biorą udział w większości procesów komórkowych obejmujących różnicowanie, odpowiedź na stres oraz podziały komórkowe, od których pochodzi nazwa tej klasy enzymów, jako aktywowanych przez czynniki wywołujące mitozę. Wspólną cechą tej grupy białek jest ich aktywacja przez kolejne kinazy w kaskadzie reakcji fosforylacji. Podgrupą należącą do tej klasy enzymów

są kinazy indukowane przez stres – SIMK (ang. *Stres-Induced MAPK*). Kinazy SIMK są obecne najpierw w inicjalnym zawiązku włośnika, a później w szczycie rosnącej wypustki, zawsze w sąsiedztwie cytoszkieletu aktywnego [58]. Inhibicja aktywności kinaz MAPK powoduje zmiany w rozmieszczeniu enzymów SIMK w komórce, co pociąga za sobą zahamowanie wzrostu włośników i ich zmienioną morfologię. Z kolei nadekspresja białek SIMK powoduje stymulację wzrostu włośników. Ścisłe powiązanie lokalizacji SIMK oraz mikrofilamentów świadczy prawdopodobnie o ich roli w fosforylacji, a zatem regulacji aktywności białek wiążących się z aktyną i zawiadujących jej reorganizacją. Przykładem takich białek są profiliny [1] oraz czynniki depolimeryzujące aktynę – ADF (ang. *Actin-Depolymerizing Factor*) [26]. W badaniach nad rozwojem włośników u kukurydzy wykazano, że sieć mikrofilamentów aktywnych razem z profilinami i czynnikami ADF bierze udział w aktywnym przemieszczaniu się elementów retikulum endoplazmatycznego w kierunku wzrastającego włośnika, gdzie uczestniczy ono w buforowaniu wysokich stężeń jonów wapnia, wpływając tym samym na efektywność przekazywania sygnałów komórkowych [1, 26].

Dodatkowych dowodów na ważną rolę mikrofilamentów w powstawaniu i wzroście włośników dostarczają mutanty *A. thaliana*, *deformed root hairs1 (der1)* [53]. Scharakteryzowano trzy alleliczne mutanty *der1*, wykształcające włośniki o różnym stopniu skrócenia w stosunku do formy dzikiej, zależnie od siły danego allelu. Zaobserwowano również, że miejsce inicjacji włośnika jest często przesunięte ku środkowej części komórki, może być powiększone, a także mogą pojawiać się dwa włośniki w jednym miejscu inicjacji. Gen *DER1* koduje jedną z głównych cząsteczek aktyny (*ACT2*), występującej w tkankach wegetatywnych. Za powstały fenotyp odpowiada mutacja zmiany sensu, prowadząca do zmian w strukturze tego białka i jego dysfunkcji. Może to prowadzić do zahamowania wzrostu szczytowego, poprzez niewystarczającą ilość wytwarzanych mikrofilamentów aktywnych oraz nieprawidłowy wybór miejsca inicjacji włośnika lub do jego rozgałęziania się, poprzez zaburzenie polaryzacji wzrostu lub nieprecyzyjny transport pęcherzyków wydzielniczych [30].

Drugi element cytoszkieletu, jakim są mikrotubule, również odgrywa istotną rolę we wzroście włośnika. Traktowanie korzeni czynnikami, powodującymi depolimeryzację mikrotubul, powoduje powstawanie włośników falistych i rozgałęzionych, a więc zaburza precyzyjną orientację ich wzrostu [8]. Podobny fenotyp obserwowano u mutantu *A. thaliana*, *microtubule organization1 (mor1)*. Gen *MOR1* koduje białko wiążące się z mikrotubulami – MAP (ang. *Microtubule-Association Protein*), które prawdopodobnie stabilizuje włókna mikrotubul i decyduje o prawidłowym wzroście szczytowym włośnika [74]. Podobnie, zredukowana ekspresja genu dla  $\alpha$ -tubuliny, budującej wraz z  $\beta$ -tubuliną dimery polimeryzujące we włókna mikrotubul, powoduje wykształcanie wielu włośników w jednym trichoblastie, włośników rozgałęzionych lub dodatkowych włośników na atrichoblastach, a więc może zmieniać wzór komórek epidermy korzenia [2].

Innym genem związanym z funkcją cytoszkieletu jest gen *IRE* [46]. Mutant *ire* charakteryzuje się skróceniem włośników do około 60% długości, jaka cechuje formę dziką. Skrócenie ich długości jest spowodowane szybszym zakończeniem wzrostu niż u formy wyjściowej. Gen *IRE* koduje nieznane wcześniej białko charakteryzujące się domeną podobną do kinaz serynowo-treoninowych. Enzymy te biorą udział w fosforylacji

białek związanych z mikrotubulami MAP, które kontrolują tworzenie tego elementu cytoszkieletu, mogą w ten sposób wpływać na wzrost włośnika.

Istotną rolę w regulacji zarówno transportu pęcherzykowego, jak i tworzenia sieci mikrofilamentów i mikrotubul odgrywają białka z rodziny Sec14p z domeną noduliny (ang. *Sec14p-nodulin domain proteins*). Białka te modulują przekazywanie sygnałów komórkowych związanych z metabolizmem lipidów i transportem pęcherzykowym i są niezbędne do utrzymywania prawidłowego wzrostu szczytowego w komórkach roślinnych. Brak ekspresji tych białek powoduje znaczne zaburzenie wzrostu, rozproszenie pęcherzyków wydzielniczych i mikrotubul, zanik sieci mikrofilamentów w szczycie włośnika oraz zakłócenia w tworzeniu gradientu wapniowego [67].

Kolejna grupa loci związana ze wzrostem szczytowym włośnika u *A. thaliana* to *ROOT HAIR DEFECTIVE: RHD3, RHD4* [60], *CAN OF WORMS1 (COW1)* [23], *BRISTLED1 (BST1)*, *CENTIPEDE (CEN1, CEN2, CEN3)* oraz wspomniany wcześniej gen *SUPERCENTIPEDE1 (SCN1)* [47]. Mutacje w wymienionych genach powodują tworzenie włośników skróconych i o zaburzonym kształcie w stosunku do formy dzikiej. Taki fenotyp sugeruje, że geny te kontrolują prawidłową polaryzację wzrostu włośnika i jego wydłużanie. Ponadto, u mutantów *cow1*, *scn1*, *bst1*, *cen2* oraz *cen3* stwierdzono tworzenie wielu włośników w jednej komórce epidermy lub włośników rozgałęzionych, co świadczy o roli tych genów w kontrolowaniu bądź liczby miejsc inicjacji, bądź też prawidłowego wzrostu szczytowego w zainicjowanym włośniku. Podobne zróżnicowanie fenotypowe zaobserwowano dla serii mutantów *deformed root hairs 1-9 (der1-9)* wykształcających włośniki silnie skrócone (*der2* i *der9*), faliste lub o nieregularnym przekroju (*der5*, *der6*, *der8*), tworzące wybrzuszenia (*der5* i *der8*), krótsze niż u formy dzikiej (wspomniany wcześniej *der1* oraz *der4* i *der7*) lub rozgałęzione (*der3*). Ponadto, u mutantów *der8* i *der9* możliwe było przywrócenie normalnego wzrostu włośników po traktowaniu etylenem i auksyną, co pozwala przypuszczać, że geny *DER8* i *DER9* związane są z regulacją sygnałów hormonalnych [54].

Jak do tej pory brak jest informacji na temat molekularnych mechanizmów działania większości z wymienionych wyżej genów, z wyjątkiem genów *RHD3* oraz *COW1*. Mutant *rhd3* charakteryzuje się krótkimi, falistymi włośnikami, skróconym korzeniem i zmniejszeniem ogólnego pokroju rośliny [60]. Dodatkowo, komórki włośnikowe mają mniejszą wakuolę oraz niewielką ilość rozproszonych pęcherzyków transportowych w szczytowej części cytoplazmy wypustki, podczas gdy u formy dzikiej w szczycie włośnika występuje znaczne ich nagromadzenie [21]. Zmniejszenie wakuoli u mutantu *rhd3* jest najprawdopodobniej powodem zahamowania wzrostu komórki, natomiast rozproszenie pęcherzyków transportowych może prowadzić do ich fuzji z błoną komórkową w przypadkowych miejscach, powodując powstanie falistych włośników. Izolacja i sekwencjonowanie genu *RHD3* wykazały, że koduje on nieznanie wcześniej wysokocząsteczkowe białko o dwóch konserwatywnych motywach charakterystycznych dla białek wiążących się z GTP. Przypuszczalnie odpowiada ono za kierowanie transportem pęcherzykowym pomiędzy siateczką endoplazmatyczną a aparatem Golgiego [79] i biogenezę wakuoli [71, 72]. Ekspresja genu *RHD3* może kontrolować aktywność innego białka, GTPazy RabA4b, które znajduje się w szczytowej części włośnika i jest związane z błonami pęcherzyków transportujących materiał budujący ścianę komórkową

[50, 49, 79]. Charakterystyka markerowych białek błonowych, typowych dla poszczególnych kompartmentów komórkowych wykazała, że system pęcherzyków szczytowych stanowi odrębny kompartment, związany funkcjonalnie z aparatem Golgiego – TGN (ang. *Trans-Golgi Network*). U mutantu *rhđ3*, białko RabA4b pojawia się w nietypowych pozycjach w rosnącym włośniku, co wiąże się z zaburzeniami wzrostu szczytowego, prawdopodobnie spowodowanymi brakiem koncentracji pęcherzyków transportowych na końcu rosnącego włośnika [50].

Mutacje w genie *COW1* dają efekt fenotypowy podobny do zmian obserwowanych u mutantu *rhđ3*, a więc powodują zaburzenia w kształcie włośników i ich długości oraz zwiększenie liczby włośników wykształcanych z jednego miejsca inicjacji [23]. Włośniki u mutantu *cow1* stanowią jedną czwartą długości wypustek tworzonych przez formę dziką, są natomiast ponad dwukrotnie szersze. W przeciwieństwie do mutantów *rhđ3*, fenotyp warunkowany przez *COW1* jest ograniczony tylko do włośników. Produkt genu *COW1* wykazuje podobieństwo do białek pośredniczących w transdukcji sygnału komórkowego z fosfatydyloinozytoli – PIP (ang. *Phosphatidylinositol Transfer Protein*), mających domeny wiążące lipidy i jest zlokalizowany w miejscu powstawania włośnika [9].

## PODSUMOWANIE

Genetyczna i molekularna kontrola tworzenia włośników obejmuje szereg zmian i procesów biochemicznych, jakie muszą zajść podczas różnicowania się komórek epidermy korzenia. Dotychczas scharakteryzowane geny i procesy wskazują na ważną rolę czynników transkrypcyjnych determinujących los komórek ryzodermy z jednej strony oraz na szlaki przekazywania sygnałów komórkowych, kierujących wzrostem włośników – z drugiej. Wskazuje na to duża liczba enzymów z grupy kinaz oraz GTPaz, a także bardzo istotna rola jonów wapnia i cząsteczek ROS, będących wtórnymi przekaźnikami sygnałów komórkowych. Wydaje się, że elementy te, poprzez swoje oddziaływanie na układ mikrotubul i mikrofilamentów oraz sterowanie zarówno systemem wydzielania substancji poprzez transport pęcherzykowy, jak i odzyskiwaniem nadmiaru błony komórkowej w drodze endocytozy, odgrywają kluczową rolę w koordynacji wzrostu włośnika. Istotne znaczenie ma również przekazywanie sygnałów hormonalnych, modulujących liczbę i zagęszczenie włośników, co może mieć szczególne znaczenie w przypadku niekorzystnego oddziaływania środowiska. Ponadto, wiele mechanizmów prowadzących do powstania włośników jest charakterystycznych nie tylko dla rozwoju ryzodermy, lecz reprezentuje bardziej uniwersalne drogi rozwoju komórek, dlatego też włośniki mogą stanowić bardzo dobry model pomagający w zrozumieniu przemian, jakie zachodzą w komórkach roślinnych podczas ich wzrostu i różnicowania.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BALUSKA F, SALAJ J, MATHUR J, BRAUN M, JASPER F, SAMAJ J, CHUA NH, BARLOW PW, VOLKMANN D. Root hair formation: F-actin dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshwork accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev Biol* 2000; **227**: 618–632.
- [2] BAO Y, KOST B, CHUA N-H. Reduced expression of  $\alpha$ -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and gravitropism. *Plant J* 2001; **28**: 145–157.
- [3] BAUMBERGER N, RINGLI C, KELLER B. The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 2001; **15**: 1128–1139.
- [4] BERGER F, HUNG C-Y, DOLAN L, SCHIEFELBEIN J. Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol* 1998; **194**: 235–245.
- [5] BERNHARDT C, LEE MM, GONZALES A, ZHANG V, LLOYD A, SCHIEFELBEIN J. The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development* 2003; **130**: 6431–6439.
- [6] BERNHARDT C, TIERNEY ML. Expression of AtPRP3, a proline-rich structural cell wall protein from *Arabidopsis*, is regulated by cell-type-specific developmental pathways involved in root hair formation. *Plant Physiol* 2000; **122**: 705–714.
- [7] BIBIKOVA TN, JACOB T, DAHSE I, GILROY S. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1998; **125**: 2925–2934.
- [8] BIBIKOVA TN, BLANCAFLOR EB, GILROY S. Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1999; **17**: 657–665.
- [9] BÖHME K, LI Y, CHARLOT F, GRIERSON C, MARROCCO K, OKADA K, LALOUE M, NOGUÉ F. The *Arabidopsis* *COW1* gene encodes a phosphatidylinositol transfer protein essential for root hair tip growth. *Plant J* 2004; **40**: 686–698.
- [10] BOSCH M, HEPLER PK. Pectin methylsterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* 2005; **17**: 3219–3226.
- [11] CASSAB GI. Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol* 1998; **49**: 281–309.
- [12] CHO HT, COSGROVE DJ. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002; **14**: 3237–3253.
- [13] COLE RA, FOWLER JE. Polarized growth: maintaining focus on the tip. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 579–588.
- [14] COSGROVE DJ. New genes and new biological roles for expansins. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 73–78.
- [15] DOLAN L. The role of ethylene in root hair development. *J Plant Nutr Soil Sci* 2001; **164**: 141–146.
- [16] DOLAN L. Pattern in the root epidermis: an interplay of diffusible signals and cellular geometry. *Ann Bot* 1996; **77**: 547–553.
- [17] DoLAN L, DUCKETT CM, GRIERSON C, LINSTEAD P, SCHNEIDER K, LAWSON E, DEAN C, POETHIG, S, ROBERTS K. Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 1994; **120**: 2465–2474.
- [18] DOLAN L, JANMAAT K, WILLEMSSEN V, LINSTEAD P, POETHIG S, ROBERTS K, SCHERES B. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 1993; **119**: 71–84.
- [19] FAVERY B, RYAN E, FOREMAN J, LINSTEAD P, BOUDONCK K, STEER M, SHAW P, DOLAN L. KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2001; **15**: 78–89.
- [20] FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL JH, MYLONA P, MIEDEMA H, TORRES MA, LINSTEAD P, COSTA S, BROWNLEE C, JONES JD, DAVIES JM, DOLAN L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 2003; **422**: 442–446.
- [21] GALWAY ME, HECKMAN JR. JW, SCHIEFELBEIN JW. Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta* 1997; **201**: 209–218.
- [22] GALWAY ME, MASUCCI JD, LLOYD AM, WALBOT V, DAVIS RW, SCHIEFELBEIN JW. The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Dev Biol* 1994; **166**: 740–754.

- [23] GRIERSON CL, ROBERTS K, FELDMANN KA, DOLAN L. The *COW1* locus of *Arabidopsis* acts after *RHD2*, and in parallel with *RHD3* and *TIP1*, to determine the shape, rate of elongation and number of root hairs produced from each site of hair formation. *Plant Physiol* 1997; **115**: 981–990.
- [24] HAUSER M-T, MORIKAMI A, BENFEY PN. Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. *Development* 1995; **121**: 1237–1252.
- [25] HEPLER PK, VIDALI L, CHEUNG AY. Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 159–187.
- [26] JIANG CJ, WEEDS AG, HUSSEY PJ. The maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin. *Plant J* 1997; **12**: 1035–1043.
- [27] JONES MA, RAYMOND MJ, YANG Z, SMIRNOFF N. NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J Exp Bot* 2007; Advance Access published on February 14, doi:10.1093/jxb/erl279.
- [28] JONES MA, SHEN J-J, FU Y, LI H, YANG Z, GRIERSON CS. The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* 2002; **14**: 763–776.
- [29] KETELAAR T, FAIVRE-MOSKALENKO C, ESSELING JJ, DE RUIJTER NC, GRIERSON CS, DOGTEROM M, EMONS AM. Positioning of nuclei in *Arabidopsis* root hairs: an actin-regulated process of tip growth. *Plant Cell* 2002; **14**: 2941–2955.
- [30] KETELAAR T, RUIJTER NCA, EMONS AMC. Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* 2003; **15**: 285–292.
- [31] KIEBER JJ, ROTHENBERG M, ROMAN G, FELDMAN KA, ECKER JR. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 1993; **72**: 427–441.
- [32] KIM DW, LEE SH, CHOI S-B, WON S-K, HEO Y-K, CHO M, PARK J-I, CHO H-T. Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *Plant Cell* 2006; **18**: 2958–2970.
- [33] KIRIK V, SIMON M, HUELSKAMP M, SCHIEFELBEIN J. The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 2004; **268**: 506–513.
- [34] KNOX K, GRIERSON CS, LEYSER O. AXR3 and SHY2 interact to regulate root hair development. *Development* 2003; **130**: 5769–5777.
- [35] KOORNNEEF M. The complex syndrome of *ttg* mutants. *Arabidopsis Information Service* 1981; **18**: 45–51.
- [36] KURATA T, ISHIDA T, KAWABATA-AWAI C, NOGUCHI M, HATTORI S, SANO R, NAGASAKA R, TOMINAGA R, KOSHINO-KIMURA Y, KATO T, SATO S, TABATA S, OKADA K, WADA T. Cell-to-cell movement of the CAPRICE protein in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 2005; **132**: 5387–5398.
- [37] LEE MM, SCHIEFELBEIN J. WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* 1999; **99**: 473–483.
- [38] LEW RR. Immediate and steady state extracellular ionic fluxes of growing *Arabidopsis thaliana* root hairs under hyperosmotic conditions. *Physiol Plant* 1998; **104**: 397–404.
- [39] LI Y, DARLEY CP, ONGARO V, FLEMING A, SCHIPPER O, BALDAUF SL, MCQUEEN-MASON SJ. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol* 2002; **128**: 854–864.
- [40] MASUCCI JD, SCHIEFELBEIN JW. The *rh6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1335–1346.
- [41] MASUCCI JD, SCHIEFELBEIN JW. Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 1996; **8**: 1505–1517.
- [42] MIZRA JI, OLSEN GM, IVERSEN T-H, MAHER EP. The growth and gravitropic responses of wild-type and auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 1984; **60**: 516–522.
- [43] MOLENDIJK AJ, BISCHOFF F, RAJENDRAKUMAR CS, FRIML J, BRAUN M, GILROY S, PALME K. *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localised to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J* 2001; **20**: 2779–2788.
- [44] NAGPAL P, WALKER LM, YOUNG JF, SONAWALA A, TIMPTE C, ESTELLE M, REED JW. *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol* 2000; **123**: 563–573.

- [45] OHASHI Y, OKA A, RODRIGUES-POUSADA R, POSSENTI M, RUBERTI I, MORELLI G, AOYAMA T. Modulation of phospholipid signalling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science* 2003; **300**: 1427–1430.
- [46] OYAMA T, SHIMURA Y, OKADA K. The IRE gene encodes a protein kinase homologue and modulates root hair growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 2002; **30**: 289–299.
- [47] PARKER JS, CAVELL AC, DOLAN L, ROBERTS K, GRIERSON CS. Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000; **12**: 1961–1974.
- [48] PESCH M, HULSKAMP M. Creating a two-dimensional pattern de novo during *Arabidopsis* trichome and root hair initiation. *Curr Opin Genet Dev* 2004; **14**: 422–427.
- [49] PREUSS ML, SCHMITZ AJ, THOLE JM, BONNER HKS, OTEGUI MS, NIELSEN E. A role for the RabA4b effector protein PI-4K $\beta$ 1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biol* 2006; **172**: 991–998.
- [50] PREUSS ML, SERNA J, FALBEL TG, BEDNAREK SY, NIELSEN E. The *Arabidopsis* Rab GTPase RabA4b localises to the tips of growing root hair cells. *Plant Cell* 2004; **16**: 1589–1603.
- [51] RAMSAY NA, GLOVER BJ. MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 63–70.
- [52] RIGAS S, DESBROSSES G, HARALAMPIDIS K, VINCENTE-AGULLO F, FELDMANN KA, GRABOV A, DOLAN L. TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* 2001; **13**: 139–151.
- [53] RINGLI C, BAUMBERGER N, DIET A, FREY B, KELLER B. ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1464–1472.
- [54] RINGLI C, BAUMBERGER N, KELLER B. The *Arabidopsis* root hair mutants der2–der9 are affected at different stages of root hair development. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1046–1053.
- [55] RYAN E, GRIERSON CS, CAVELL A, STEER M, DOLAN L. TIP1 is required for both tip growth and non-tip growth in *Arabidopsis*. *New Phytol* 1998; **138**: 49–58.
- [56] SAMAJ J, BALUSKA F, MENZEL D. New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 217–220.
- [57] SAMAJ J, MULLER J, BECK M, BOHM N, MENZEL D. Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 594–600.
- [58] SAMAJ J, OVECKA M, HLAVACKA A, LECOURIEUX F, MESKIENE I, LICHTSCHEIDL I, LENART P, SALAJ J, VOLKMANN D, BOGRE L, BALUSKA F, HIRT H. Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J* 2002; **1**: 3296–3306.
- [59] SCHIEFELBEIN JW. Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1525–1531.
- [60] SCHIEFELBEIN JW, SOMERVILLE C. Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 1990; **2**: 235–243.
- [61] SCHNEIDER K, WELLS B, DOLAN L, ROBERTS K. Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* primary roots. *Development* 1997; **124**: 1789–1798.
- [62] SONG XF, YANG CY, LIU J, YANG WC. RPA, a class II ARFGAP protein, activates ARF1 and U5 and plays a role in root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 966–976.
- [63] SUGIMOTO-SHIRASU K, ROBERTS GR, STACEY NJ, MCCANN MC, MAXWELL A, ROBERTS K. RHL1 is an essential component of the plant DNA topoisomerase VI complex and is required for ploidy-dependent cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 18736–18741.
- [64] THOMPSON JE, FRY SC. Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. *Plant J* 2001; **26**: 23–34.
- [65] TURING AM. The chemical basis of morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1952; **237**: 37–72.
- [66] VERY AA, DAVIES JM. Hyperpolarisation-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 9801–9806.
- [67] VINCENT P, CHUA M, NOGUE F, FAIRBROTHER A, MEKEEL H, XU Y, ALLEN N, BIBIKOVA TN, GILROY S, BANKAITIS VA. A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *J Cell Biol* 2005; **168**: 801–812.
- [68] VISSENBERG K, FRY SC, VERBELEN J-P. Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 2001; **127**: 1125–1135.
- [69] WADA T, TACHIBANA T, SHIMURA Y, OKADA K. Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by MYB homologue CPC. *Science* 1997; **277**: 1113–1116.

- [70] WALKER AR, DAVISON PA, BOLOGNESI-WINFIELD AC, JAMES CM, SRINIVASAN N, BLUNDELL TL, ESCH JJ, MARKS MD, GRAY JC. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 1999; **11**: 1337–1349.
- [71] WANG H, LEE MM, SCHIEFELBEIN JW. Regulation of the cell expansion gene RHD3 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* 2002; **129**: 638–649.
- [72] WANG H, LOCKWOOD SK, HOELTZEL MF, SCHIEFELBEIN JW. The ROOT HAIR DEFFECTIVE3 gene encodes an evolutionary conserved protein with GTP-binding motifs and is required for regulated cell enlargement in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 1997; **11**: 799–811.
- [73] WEBB M, JOUANNIC S, FOREMAN J, LINSTEAD P, DOLAN L. Cell specification in the *Arabidopsis* root epidermis requires the activity of ECTOPIC ROOT HAIR 3– a katanin-p60 protein. *Development* 2002; **129**: 123–131.
- [74] WHITTINGTON AT, VUGREK O, WEI KJ, HASENBEIN NG, SUGIMOTO K, RASHBROOK MC, WASTENEYS GO. *MOR1* is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 2001; **411**: 610–613.
- [75] WILSON A, PICKETT FB, TURNER JC, ESTELLE M. A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol Gen Genet* 1990; **222**: 377–383.
- [76] WYMER CL, BIBIKOWA TN, GILROY S. Cytoplasmic free calcium distribution during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1997; **12**: 427–439.
- [77] XU J, SCHERES B. Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell* 2005; **17**: 525–536.
- [78] YANG Z. Small GTPases: versatile signalling switches in plants. *Plant Cell* 2002; **14**: S375–S388.
- [79] ZHENG H, KUNST L, HAWES C, MOORE I. GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant J* 2004; **37**: 398–414.

*Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz*

*Otrzymano: 15.04. 2007 r.*

*Przyjęto: 22.05. 2007 r.*

*ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice*

*e-mail: ajaniak@us.edu.pl*