

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Čabelková

Reakce rostlin na přítomnost amonného iontu v prostředí
Reaction of plants to the presence of ammonium ion in the environment

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marek Šustr

Praha, 2019

Poděkování:

Chtěla bych moc poděkovat své školitelce RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za její úžasnou ochotu, užitečné rady a veškerou pomoc, kterou mi poskytla při psaní této práce. Děkuji svému příteli Dominikovi za jeho optimismus a podporu při psaní této práce. A nakonec děkuji své mamce Pavlíně, tetě Evě a strejdovi Liborovi, kteří mi věřili po celou dobu mého bakalářského studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 7.5.2019

Barbora Čabelková

.....

Abstrakt

NH_4^+ je jednou z hlavních anorganických forem dusíku, kterou rostliny přijímají z půdy pomocí kořenů. Reakce rostlin na NH_4^+ závisí na řadě faktorů – především na jeho koncentraci v rhizosféře nebo na dostupnosti dalších iontů, jako je NO_3^- nebo K^+ . V případě nízké dostupnosti dusíku v rhizosféře, NH_4^+ pozitivně ovlivňuje růst kořenového systému. V oblasti rhizosféry bohaté na NH_4^+ může dojít k lokální stimulaci větvení postranních kořenů za účelem efektivního získání přítomného zdroje dusíku. Senzorem, který vnímá NH_4^+ a indukuje odpověď kořenového systému, je vysokoafinitní transportér amonného iontu AMT1;3. Při nadbytku NH_4^+ dochází k inhibici růstu celé rostliny a tento jev je nazýván jako syndrom toxicity amonného iontu. Syndrom je výsledkem interference NH_4^+ s různými procesy v rostlině a mezi jeden z nejdůležitějších patří indukovaná deficienze K^+ . NH_4^+ a K^+ mezi sebou přímo interferují, protože NH_4^+ vstupuje do rostliny prostřednictvím K^+ kanálů a také inhibuje expresi vysokoafinitních transportérů pro K^+ , čímž výrazně snižuje jeho příjem. Právě interference NH_4^+ a K^+ je jedním z hlavních témat, na které se tato bakalářská práce zaměřuje. Dále také shrnuje mechanismy příjmu a zpracování NH_4^+ , mechanismy toxicity NH_4^+ a reakce kořenového systému na různou koncentraci NH_4^+ v rhizosféře.

Klíčová slova: amonná výživa, syndrom toxicity amonného iontu, draselná výživa, kořenový systém, NH_4^+ a K^+ interference

Abstract

NH_4^+ is one of the major inorganic forms of nitrogen taken up by plant roots from the soil. The response of plants to NH_4^+ depends on a number of factors – especially its concentration in the rhizosphere or the availability of other ions such as K^+ or NO_3^- . In the case of a low nitrogen availability in the rhizosphere, NH_4^+ positively affects the growth of the root system. In the NH_4^+ -rich area of rhizosphere, local stimulation of lateral root branching may occur to enhance effective acquisition of the present nitrogen source. A sensor that perceives NH_4^+ and induces this response of root system response is the high affinity ammonium transporter AMT1;3. With excess NH_4^+ , the growth of the whole plant is inhibited and this phenomenon is called ammonium toxicity syndrome. This syndrome is the result of the interaction of NH_4^+ with various processes in the plant and induced K^+ deficiency is one of the most important signs of this syndrome. NH_4^+ and K^+ directly interfere with each other during uptake. NH_4^+ enters the plant through K^+ channels and also inhibits the expression of the high affinity K^+ transporters, thereby significantly reduces its uptake. NH_4^+ and K^+ interference is one of the main topics that this bachelor thesis focuses on. It also summarizes mechanisms of uptake and assimilation of NH_4^+ , mechanisms of NH_4^+ toxicity and reaction of root system to different NH_4^+ concentrations in rhizosphere.

Key words: ammonium nutrition, ammonium toxicity syndrome, potassium nutrition, root system, NH_4^+ and K^+ interference

Obsah

1. Úvod	1
2. Rostlina a dusík	2
2.1 Příjem NH_4^+	3
2.1.1 HATS - vysokoafinitní transportní systém	3
2.1.2 LATS - nízkoafinitní transportní systém	4
2.2 Příjem NH_3	5
2.3 Zpracování NH_4^+	5
2.3.1 GS/GOGAT cyklus	5
2.3.2 Zpracování NH_4^+ pomocí jiných enzymů	6
2.3.3 Uložení do vakuoly	7
3. Reakce rostlin na přítomnost NH_4^+ v prostředí	8
3.1 Syndrom toxicity amonného iontu	9
3.1.1 Mechanismy toxicity NH_4^+	10
3.2 Reakce kořenového systému na NH_4^+	13
4. Interference NH_4^+ s K^+ výživou	18
4.1 Příjem K^+	19
4.2 Interference NH_4^+ s K^+ na úrovni příjmu a výdeje	20
4.2.1 Úroveň příjmu	20
4.2.2 Úroveň výdeje	23
4.3 Role kinázy CIPK23 v optimalizaci příjmu N a K	24
4.4 Možný efekt interference na utváření kořenového systému	25
5. Závěr	26
6. Seznam použitých zdrojů	27

Seznam použitých zkratk

- AtAKT1 – draselný vtokový kanál u *Arabidopsis* (z angl. *Arabidopsis* K⁺ transport channel)
- AtHAK5 – vysokoafinitní transportér pro příjem K⁺ u *Arabidopsis* (z angl. *Arabidopsis thaliana* high affinity K⁺ 5)
- AMT/MEP/Rh – transportéry amonného iontu (z angl. ammonium transporter/methylammonium permease/rhesus)
- AS – asparaginsyntetáza
- AUX1 – transportér auxinu zajišťující vstup auxinu do buňky (z angl. auxin transporter protein 1)
- CAP1 – receptorová kináza lokalizovaná na tonoplastu (z angl. Ca²⁺-associated protein 1)
- CBL protein - calcineurin B – like protein (z angl. calcineurin B – like protein)
- CIPK23 – calcineurin – B like protein interagující proteinkináza 23 (z angl. calcineurin B – like interacting protein kinase 23)
- CPS – carbamoylfosfátsyntetáza HATS – vysokoafinitní transportní systém (z angl. high-affinity transport system)
- GDH – glutamátdehydrogenáza
- GOGAT – glutamin-oxoglutarátaminotransferáza/glutamátsyntetáza
- GORK – draselný výtokový kanál (z angl. guard cell outward rectifying K⁺ channel)
- GS – glutaminsyntetáza
- hsn1* – mutant *Arabidopsis* hypersenzitivní k NH₄⁺ (z angl. hypersensitive to NH₄⁺ 1)
- HvHAK1 – vysokoafinitní transportér pro příjem K⁺ u ječmene (z angl. *Hordeum vulgare* high affinity K⁺ 1)
- HvHKT2;1 – vysokoafinitní transportér pro K⁺ u ječmene (z angl. *Hordeum vulgare* high affinity K⁺ transporter)
- KAT1 – draselný vtokový kanál (z angl. K⁺ channel in *Arabidopsis thaliana* 1)
- KIRC – draselný vtokový kanál (z angl. K⁺ inward-rectifying channel)
- KUP/HAK/KT – rodina transportérů draselného iontu (z angl. K⁺ uptake/high affinity K⁺/K⁺ transport)
- LATS – nízkoafinitní transportní systém (z angl. low-affinity transport system)
- MEP – transportéry pro NH₄⁺ u kvasinek (z angl. methylammonium permease)
- NiR - nitritreduktáza
- NR - nitrátreduktáza
- NRT1;1 – transportér nitrátu (z angl. nitrate transporter 1;1)
- NSCC – nespecifický kationtový kanál (z angl. non-selective cation channel)
- PIN2 – transportér auxinu zajišťující výdej auxinu z buňky (z angl. pin-formed 2)
- TEA- tetraethylammonium
- TIP2;2 – aquaporin lokalizovaný na tonoplastu (z angl. tonoplast intrinsic protein 2;2)
- TRK – transportéry pro K⁺ u kvasinek (z angl. transport of K⁺)

1. Úvod

Dusík patří spolu s několika dalšími prvky mezi tzv. biogenní prvky, což jsou prvky, které rostliny nutně potřebují ke svému životu. Mimořádná důležitost dusíku může být doložena tím, že je součástí struktur, které umožňují existenci života takovou, jakou ji známe. Mezi tyto struktury patří např. nukleové kyseliny (DNA, RNA), dále aminokyseliny a z nich složené proteiny s nejrůznějšími funkcemi, např. s funkcí enzymatickou. Právě proto, že je dusík součástí veškerého dění rostlinného těla, je důležité, aby byl v optimálním množství rostlinou přijímán. Optimálním množstvím je myšleno takové množství, které bude rostlině prospívat.

Na naší planetě se dusík vyskytuje v hojném množství v atmosféře, kde se ho nachází kolem 78%. Rostliny však nejsou schopné bez pomoci jiných organismů, např. bakterií rodu *Rhizobium*, přijímat vzdušný dusík, a tak jsou závislé na příjmu dusíku z půdy. V půdě probíhá celá řada procesů, které vedou k produkci sloučenin obsahující dusík, ale ne všechny formy dusíku jsou pro rostliny dostupné. Mezi nejvýznamnější anorganické zdroje dusíku patří NO_3^- a NH_4^+ , které jsou přijímány pomocí přenašečů a kanálů v membránách kořenových buněk. Hlavním zdrojem dusíku v buňce a tím, co je dále zpracováváno metabolismem, se stává NH_4^+ , neboť přijímaný NO_3^- musí být v buňce redukován právě na NH_4^+ , aby bylo umožněno dusík efektivně využít.

Jak jsem zmínila výše, každý iont by měl být přijímán v optimálním množství. Ovšem splnit tuto podmínku u NH_4^+ může být problém. NH_4^+ se kromě toho, že vzniká přirozeně v půdě, dostává do půdy ve větší míře i činností lidí, a to především používáním průmyslových hnojiv, jejichž hlavní součástí jsou právě amonné a nitrátové soli. V současné době je zásadním problémem zvýšená kyselost zemědělských půd, která přímo přispívá k většímu výskytu NH_4^+ nad jinými formami dusíku (Esteban et al., 2016). NH_4^+ také vzniká přirozeně v samotných buňkách, a to při fotorespiraci či rozkladu aminokyselin. Pokud se tedy produkce a příjem amonných iontů v buňkách nevyrovná jejich využití, nastává problém akumulace. Mezi příznaky nadbytku NH_4^+ patří nedostatečnost fotosyntézy v důsledku úbytku chlorofylu a inhibice růstu kořenů i růstu nadzemní části rostliny. Tento problém se označuje jako syndrom toxicity amonného iontu (Britto and Kronzucker, 2002). Ukazuje se, že u rostlin může v případě nadbytku NH_4^+ dojít ke zvýšení exprese genů pro enzymy asimilující NH_4^+ , což podporuje jeho zpracování a mírní projevy akumulace (Guan et al., 2016). S toxicitou NH_4^+ souvisí řada dalších jevů, které byly při jeho nadměrné koncentraci pozorovány, např. deficiencie ostatních iontů. Dodnes však není jasný jeden přesný mechanismus, který by toxicitu NH_4^+ způsoboval (Bittsánszky et al., 2015).

Na druhé straně, NH_4^+ může v určitých podmínkách prostředí pozitivně působit na utváření kořenového systému. Je vnímán jako signál a může indukovat lokální stimulaci růstu postranních kořenů (Liu and von Wirén, 2017). Takový kořenový systém, který se právě v odpovědi na NH_4^+ může neustále vyvíjet, umožňuje rostlinám efektivnější získávání vody a minerálních látek.

Koncentrace NH_4^+ v půdě je významná i ve vztahu k příjmu dalších esenciálních prvků. V souvislosti s draselnou výživou je dokázáno, že určitá koncentrace NH_4^+ inhibuje příjem K^+ . Jedním z důvodů, proč se tak děje, je chemická podobnost mezi NH_4^+ a K^+ , na jejímž základě využívá NH_4^+ draselné kanály k vlastnímu transportu a tím inhibuje příjem K^+ . Dalším důvodem je skutečnost, že NH_4^+ negativně ovlivňuje vysokoafinitní draselné transportéry (Coskun et al., 2017). Problematika interference mezi NH_4^+ a K^+ je tedy důležitým tématem jednak ve vztahu k optimální draselné výživě, ale také ve vztahu k celkovému vývoji rostlin.

Cílem této práce je shrnout, jak rostlina reaguje na přítomnost amonného iontu, ukázat pozitiva i negativa působení NH_4^+ a především popsat interferenci draselné a amonné výživy, která má pravděpodobně velký vliv na vývoj rostlinného organismu.

2. Rostlina a dusík

Jak jsem již v úvodu zmínila, NH_4^+ je jednou z hlavních anorganických forem dusíku, které může rostlina přijímat. Kromě anorganických sloučenin však může přijímat také organické sloučeniny, např. aminokyseliny nebo močovinu (Marschner, 2011). NH_4^+ se v dobře prokysličených půdách vyskytuje v nižších koncentracích oproti NO_3^- . Aerobní prostředí totiž zajišťuje vhodné podmínky pro nitrifikační mikroorganismy, které mohou rychle přeměňovat NH_4^+ na NO_3^- . Naopak v kyselých nebo zamokřených půdách, kde je nedostatek kyslíku, probíhá nitrifikace daleko pomaleji (Brady and Weil, 1996), a obsah NH_4^+ může být v takových půdách daleko vyšší. Obecně je však známo, že většina rostlin nejvíce prospívá při smíšené výživě NH_4^+ a NO_3^- (Gazzarrini et al., 1999). Existují ale i rostliny, u kterých je jedna z forem anorganického dusíku do jisté míry preferována. Příkladem mohou být jehličnany, které preferují příjem NH_4^+ a může sem patřit např. smrk sivý (*Picea glauca*), u kterého byl pozorován až 20x vyšší příjem NH_4^+ než NO_3^- (Kronzucker et al., 1997). Naopak např. jahodník (rod *Fragaria*) je rostlina preferující příjem NO_3^- před NH_4^+ (Claussen and Lenz, 1999).

2.1 Příjem NH_4^+

Příjem NH_4^+ z půdy je zprostředkován pomocí specifických přenašečů či některých méně specifických kanálů v plazmatických membránách buněk kořenů. Jak shrnují Zhou et al., (2015), rozlišujeme dva typy transportních systémů podle toho, jestli jsou efektivní při příjmu z prostředí s nízkou (mikromolární) nebo s vysokou (milimolární) koncentrací požadované látky. V případě nízké koncentrace dané látky se uplatňuje HATS (vysokoafinitní transportní systém), při vysoké koncentraci se uplatňuje LATS (nízkoafinitní transportní systém). Tento dvoufázový příjem NH_4^+ byl studován a popsán už více než před 20 lety (Kronzucker et al., 1996).

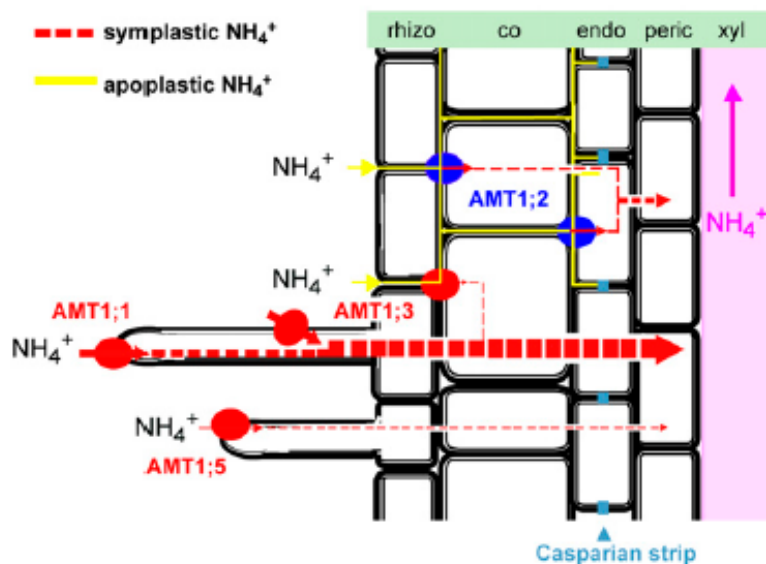
2.1.1 HATS - vysokoafinitní transportní systém

Tento transport NH_4^+ přes membrány zajišťuje napříč organismy tzv. AMT/MEP/Rh rodina proteinů (z angl. ammonium transporter/methylammonium permease/rhesus). Je to rodina sekvenčně homologních proteinů, které transportují NH_4^+ v rostlinách (AMT), v kvasinkách (MEP) a u lidí (Rh) (Ludewig et al., 2007; Wirén and Merrick, 2004). AMT jsou studovány v největší míře na rostlinném modelovém organismu - *Arabidopsis thaliana*. U této rostliny bylo doposud objeveno celkem 6 AMT, které se rozdělují na AtAMT1 (AtAMT1;1 – AtAMT1;5) a AtAMT2 (AtAMT2;1) (Sohlenkamp, 2002; Yuan et al., 2007).

Ve skupině AtAMT1 najdeme především přenašeče vyskytující se v rhizodermis kořene, mezi které patří např. AtAMT1;1 a AtAMT1;3, ale také v endodermis kořene, kam patří např. AtAMT1;2 (viz obrázek č. 1). Jako vysokoafinitní transportéry jsou v této skupině klasifikovány právě AtAMT1;1 a AtAMT1;3. Zjištěno to bylo pomocí *amt1;1* a *amt1;3* mutantních rostlin nesoucích inzerci v genech pro oba transportéry AMT1;1 i AMT1;3. V těchto inzerčních mutantech se v podmínkách nízké externí koncentrace NH_4^+ snížil vtok NH_4^+ zhruba o 70%, což je nepochybně pádný důvod pro zařazení AtAMT1;1 a AtAMT1;3 mezi HATS (Loqué et al., 2006). Všechny transportéry AtAMT1 se ale nemusí nacházet jen v kořenech. AtAMT1;4 se vyskytuje v pylu, kde zajišťuje přísun potřebného dusíku (Yuan et al., 2009).

Transportér AtAMT2;1 najdeme převážně v listech, stoncích a v kořenech rostlin. V listech a stoncích se podílí na transportu NH_4^+ mezi jednotlivými buňkami a pravděpodobně hraje roli i při fotorespiraci, konkrétně při recyklaci NH_4^+ (Sohlenkamp, 2002). Co se týče funkce v kořenech, tak právě AtAMT2;1 je tím transportérem, který zajišťuje translokaci NH_4^+ z podzemních do nadzemních částí rostliny (Giehl et al., 2017).

Transportéry AMT zajišťují sekundární aktivní transport. Např. PvAMT1;1 (*Phaseolus vulgaris* AMT1;1) je popsán jako symporter, tudíž se společně s 1 NH_4^+ dostává do buňky i 1 H^+ (Ortiz-Ramirez et al., 2011). Příjem NH_4^+ je ale spojen i s výdejem H^+ do okolí, protože při jeho příjmu dochází k depolarizaci membrány, která zvyšuje aktivitu membránových H^+ -ATPáz (Wang et al., 1993a; Zhu et al., 2009).



Obrázek č. 1 – lokalizace přenašečů AMT1

AMT1;1, AMT1;3 a AMT1;5 jsou vysokoafinitní přenašeče, které se nacházejí v rhizodermis kořene a v kořenových vláscích a zajišťují příjem NH_4^+ do symplastu již v povrchových vrstvách kořene. AMT1;2 se nachází spíše v hlubších vrstvách kořene, a to v primární kůře a v endodermis, kde zajišťuje příjem NH_4^+ z apoplastu primární kůry do symplastu a spolupodílí se tak na transportu NH_4^+ do xylému.

Rhizo – rhizodermis; co – primární kůra; endo – endodermis; peric – pericykl; xyl - xylém

Převzato z Yuan et al., 2007.

2.1.2 LATS - nízkoafinitní transportní systém

Tento transport NH_4^+ je většinou zprostředkován různými méně specifickými přenašeči a kanály, které jsou primárně určené pro transport jiných iontů, než je NH_4^+ . Transport probíhá na základě podobnosti ve velikosti iontů a v náboji mezi primárně přijímaným iontem a NH_4^+ . Zařadit sem můžeme např. rodinu draselných kanálů KIRC (z angl. K^+ inward-rectifying channels), do které se řadí např. kanál KAT1 (z angl. K^+ channel in *Arabidopsis thaliana* 1), který primárně transportuje K^+ , ovšem kvůli podobnosti obou iontů transportuje též NH_4^+ (Schachtman et al., 1992). Také neselektivní kationtové kanály NSCC (z angl. non-selective cation channels) mohou transportovat jak K^+ , tak NH_4^+ (Balkos et al., 2009). Většinou se tedy jedná o pasivní transport.

2.2 Příjem NH₃

Kořenové buňky mohou z půdy přijímat i deprotonovanou formu NH₄⁺, a to NH₃. Amoniak může procházet přes plazmatickou membránu prostou difúzí, jelikož je to malá a nenabitá molekula. Při vysokých koncentracích v půdě jsou pro příjem typické především aquaporiny (Saparov et al., 2007), protože NH₃ a H₂O jsou si strukturně velice podobné. NH₃ může být při nízkých koncentracích přijímán i pomocí přenašečů z rodiny AMT. Některé práce totiž naznačují, že transportér AMT primárně přijme NH₄⁺ a v silně hydrofobní oblasti daného transportéru dojde k deprotonaci iontu. A proto je ve výsledku do buňky přijat NH₃ (Khademi et al., 2004).

2.3 Zpracování NH₄⁺

2.3.1 GS/GOGAT cyklus

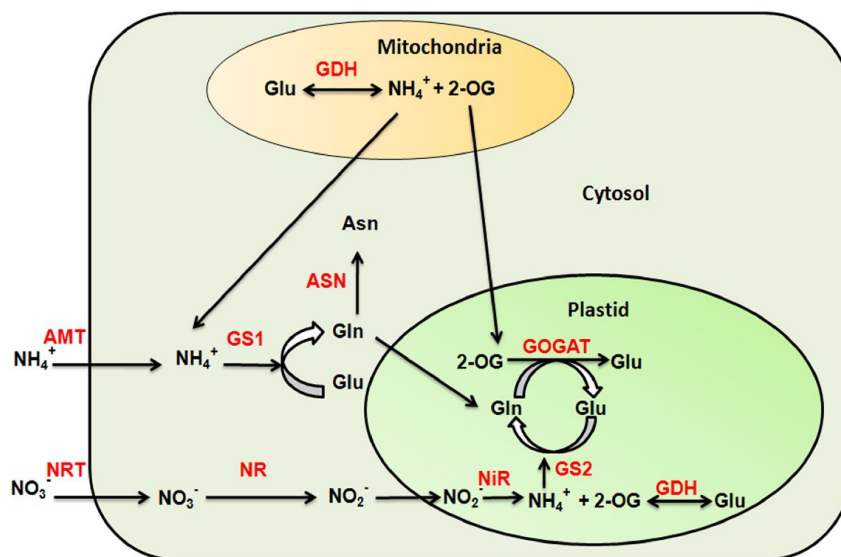
Poté, co se NH₄⁺ dostane do buňky, je téměř okamžitě metabolizován, a to nejen z důvodu syntézy aminokyselin, ale i z důvodu jeho možného hromadění v buňce (viz kapitola Syndrom toxicity amonného iontu). Stěžejní dráhou zpracování NH₄⁺ je tzv. GS/GOGAT cyklus (Lea and Mifflin, 1974; Mifflin and Lea, 1976). Tento cyklus je pojmenován podle enzymů, které se v něm uplatňují. Mezi tyto enzymy tedy patří GS (glutaminsyntetáza) a GOGAT (glutamin-oxoglutarátaminotransferáza/glutamátsyntáza). Tyto enzymy se vyskytují ve více izoformách. V případě GS můžeme v rostlinách najít jednu z forem GS1 v cytosolu, kde se vyskytuje ve větším počtu izoform, zatímco forma GS2 je lokalizovaná v plastidech (Hirel and Gadal, 1980; Wallsgrove et al., 1979). Stejně tak i enzym GOGAT se vyskytuje ve více izoformách, konkrétně jsou to NADH-dependentní forma - NADH-GOGAT v cytosolu a ferredoxin dependentní forma - Fd-GOGAT v plastidech (Dougall, 1974; Lea and Mifflin, 1974). Podle toho, jakým způsobem je NH₄⁺ generován (příjmem z půdy nebo fotorespirací) a kde v buňce je lokalizován (v cytosolu nebo v chloroplastu), fungují při jeho zpracování enzymy lokalizované právě v daném kompartmentu.

V plastidech je prvním krokem reakce mezi NH₄⁺ a glutamátem, při které vzniká glutamin. Reakce je katalyzována enzymem GS2. Dále probíhá transaminační reakce vzniklého glutaminu s 2-oxoglutarátem za vzniku dvou molekul glutamátu. Tuto reakci pohání enzym Fd-GOGAT a uzavírá se tak GS/GOGAT cyklus (viz obrázek č. 2), jak shrnují Mifflin a Lea, (1980).

Při příjmu z půdy a následném vstupu do cytosolu je zásadní reakce mezi NH₄⁺ a glutamátem za vzniku glutaminu, stejně jako v plastidech. Reakce je katalyzována některou z izoform enzymu GS1 v cytosolu (Mifflin and Lea, 1980). Kromě toho, že se glutamin jako

aminokyselina podílí na tvorbě proteinů, je také velmi důležitý z hlediska koncentrace v cytosolu, a to z důvodu regulace příjmu NH_4^+ . Bylo totiž zjištěno, že glutamin reguluje expresi genů pro transportéry AMT. Studováno to bylo např. na *Arabidopsis* (Rawat et al., 1999) a na rýži seté (*Oryza sativa*) (Sonoda et al., 2003).

V případě, že rostlina přijme z půdy NO_3^- , musí být tento iont redukován na NH_4^+ . Tato redukce se odehrává v cytosolu a následně i v chloroplastu za účasti enzymů NR (nitrát-reduktáza) a NiR (nitrit-reduktáza) (Tischner, 2000). Z hlediska energetických nákladů na zpracování a zabudování do organických látek je tedy výhodnější přijmout NH_4^+ , kde nemusí probíhat žádná redukce.



Obrázek č. 2 – zjednodušené schéma asimilace NH_4^+

NRT – transportér nitrátu; NR – nitrát-reduktáza; NiR – nitrit-reduktáza; AMT – transportér amonného iontu; GS1 – glutamínsyntetáza 1; GS2 – glutamínsyntetáza 2; GOGAT – glutamin-oxoglutarátaminotransferáza; GDH – glutamátdehydrogenáza; 2-OG – 2-oxoglutarát; Glu – glutamát; Gln – glutamin; ASN – asparagínsyntetáza; Asn – asparagin.

Převzato z Goel and Singh, 2015.

2.3.2 Zpracování NH_4^+ pomocí jiných enzymů

Zpracování NH_4^+ nemusí probíhat jen za pomoci výše uvedených enzymů. Na zabudování se může podílet i jiný enzym, a to GDH (glutamátdehydrogenáza). Tento enzym byl z hlediska asimilace NH_4^+ považován za stěžejní, avšak už dlouho se ví, že tomu tak není. GDH katalyzuje reakci mezi NH_4^+ a 2-oxoglutarátem, při níž opět vzniká glutamát, podobně jako ve druhé části GS/GOGAT cyklu. Glutamát může být enzymem GDH zpětně přeměněn

na 2-oxoglutarát a NH_4^+ (viz obrázek č. 2). Tato reakce je tedy reverzibilní (Lam et al., 1996; Mifflin and Lea, 1980). Ačkoliv bylo vyvráceno, že by GDH hrál hlavní roli při zabudování NH_4^+ (Lea and Mifflin, 1974), reakce katalyzované tímto enzymem by neměly zůstat v pozadí. Pokud se rostlina nachází v nedostatku světla a trpí sníženou činností fotosyntézy, GDH hraje významnou roli v metabolismu NH_4^+ (Miyashita and Good, 2008). Ve vztahu k syndromu toxicity amonného iontu se podle některých studií GDH jeví jako enzym, který je za podmínek vysoké koncentrace NH_4^+ výrazně nadprodukován a pomáhá vyrovnat se s nadbytečnou koncentrací NH_4^+ (Skopelitis et al., 2006).

Mezi další enzymy, které mohou zasáhnout do metabolismu NH_4^+ , patří AS (asparaginsyntetáza), která katalyzuje přenos amidoskupiny z glutaminu na aspartát za vzniku glutamátu a asparaginu (Lam, 2003), nebo CPS (carbamoylfosfátsyntetáza), která vytváří karbamoylfosfát, prekurzor citrulinu a argininu, pomocí amidoskupiny glutaminu či samotného NH_4^+ (Potel et al., 2009).

2.3.3 Uložení do vakuoly

Ne vždy je veškerý NH_4^+ zpracován výše uvedenými enzymy, ale část přijatého NH_4^+ může být uložena do vakuoly. Je to dokázáno např. na rýži seté a může to být zřejmě i jeden z důvodů, proč je rýže tolik odolná k vysokým koncentracím NH_4^+ (Wang et al., 1993b). V tonoplastu vakuoly byl objeven protein CAP1 (z angl. Ca^{2+} -associated protein), který funguje jako receptorová kináza a umožňuje iontu NH_4^+ přenos z cytoplazmy do vakuoly, čímž reguluje obsah NH_4^+ v cytoplazmě. CAP1 je jako receptor schopen vnímat koncentraci NH_4^+ v cytoplazmě a na jejím základě fosforylovat neznámý protein tonoplastu, který je pravděpodobně blízký proteinům zajišťujícím transport NH_4^+ skrze tonoplast (TIP - z angl. tonoplast intrinsic protein). Zmíněnou fosforylací se aktivuje transportní systém, který zprostředkuje příjem NH_4^+ do vakuoly. CAP1 pravděpodobně zajišťuje i správný vývoj kořenových vlásků skrze změny v Ca^{2+} gradientu během jednotlivých fází vývoje. Tato funkce CAP1 byla testována pomocí „knockout“ mutantních rostlin *Arabidopsis* v genu *CAP1*. Zjistilo se, že mutanti *cap1-1* mají v cytoplazmě kořenových buněk vysoké hodnoty NH_4^+ a zároveň je u nich výrazně inhibována elongace kořenových vlásků. Navíc se jim snížila hodnota vtoku NH_4^+ do vakuol a jeho obsah byl ve vakuolách menší oproti normálním rostlinám. V dalším kroku byly mutantní rostliny pěstovány na médiu s různými hodnotami pH, s přidáním ethylenu či s deficiencí PO_4^{3-} , K^+ nebo NH_4^+ . Pouze v případě, kdy v médiu chyběl NH_4^+ , došlo k obnově správné tvorby kořenových vlásků. Z toho vyplývá, že mutant *cap1-1* nedokáže regulovat

koncentraci NH_4^+ ukládáním do vakuoly a vysoká koncentrace NH_4^+ v cytoplazmě nedovolí vytvořit Ca^{2+} gradient, čímž ani nemůže dojít ke správné elongaci kořenových vlásků (Bai et al., 2014). Do vakuoly se také může dostat NH_3 především díky specifickým aquaporinům v tonoplastu. Příkladem takového aquaporinu může být TIP2;2 (z angl. tonoplast intrinsic protein 2;2) (Uenishi et al., 2014).

3. Reakce rostlin na přítomnost NH_4^+ v prostředí

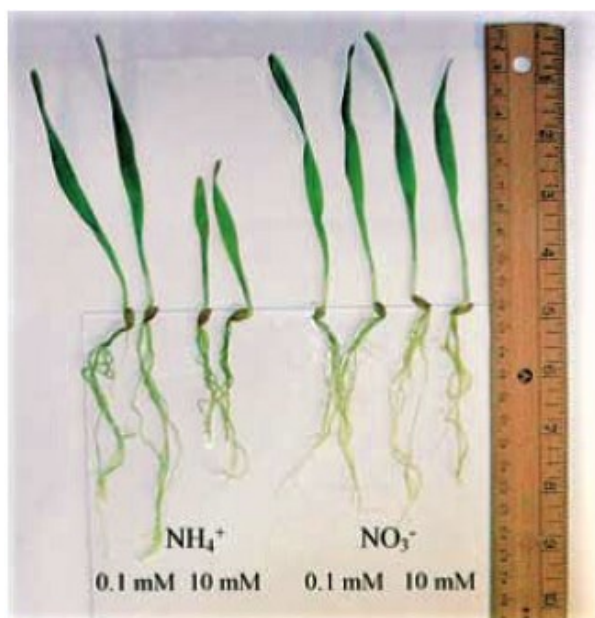
Když si položíme otázku, jak rostliny reagují na přítomnost NH_4^+ v prostředí, odpověď není úplně jednoduchá. Reakce rostlin na NH_4^+ záleží na mnoha okolnostech a zahrnuje jak negativní, tak pozitivní odpovědi. O tom, zda bude reakce na NH_4^+ pozitivní či negativní, rozhoduje především koncentrace NH_4^+ , druh rostliny, ale i třeba dostupnost ostatních iontů (především NO_3^- a K^+). Pokud se rostlina nachází ve vysokých koncentracích NH_4^+ a zároveň je tento iont převažujícím zdrojem dusíku, většinou dochází k negativní reakci projevující se tzv. syndromem toxicity amonného iontu. Co je to ale vysoká koncentrace? Zde narážíme na další okolnost, a to na druh rostliny. U některých druhů rostlin, jako je např. ječmen setý (*Hordeum vulgare*), můžeme pozorovat toxický projev NH_4^+ při koncentracích, které u jiného druhu rostliny, např. rýže seté, zmíněný stav ještě nezpůsobí, nebo ho způsobí v menší míře. Jednotlivé druhy rostlin se tedy liší v citlivosti k NH_4^+ (Britto and Kronzucker, 2002). Tato citlivost záleží na mnoha faktorech, např. na kapacitě každé buňky zpracovat NH_4^+ z hlediska množství asimilačních enzymů (Cruz et al., 2006). Velice také záleží na dostupnosti ostatních iontů - pokud je zvýšen příjem iontů NO_3^- a K^+ , syndrom toxicity se výrazně zmírňuje i přes to, že je koncentrace NH_4^+ v půdě stále stejná (Balkos et al., 2009; Hachiya et al., 2012). Především smíšená výživa anorganickými zdroji dusíku (NH_4^+ a NO_3^-) je pro rostlinu nejprospěšnější a může zmírňovat projevy toxicity (Garnica et al., 2009). Např. na rostlinách *Arabidopsis thaliana* bylo potvrzeno, že projevy toxicity jsou v případě pouhé amonné výživy daleko horší než při kombinované výživě s NO_3^- (Hachiya et al., 2012). Avšak měření provedená v této studii nepotvrdila, že by NO_3^- fungoval tak, že by mírnil akumulaci NH_4^+ nebo deficienci ostatních prvků. Naopak bylo pozorováno, že zmírnění toxicity je založeno spíše na obsahu nitrátu v prýtu rostlin, což by mohlo souviset s příjmem či signální rolí nitrátu (Hachiya et al., 2012).

Na druhou stranu, pokud se daný druh rostliny nachází v celkových podmínkách nedostatku dusíku a lokálně je mu v médiu či substrátu aplikován NH_4^+ , můžeme pozorovat pozitivní účinek z hlediska větvení postranních kořenů (Drew, 1975; Lima et al., 2010). Tudiž

mezi pozitivním a negativním účinkem NH_4^+ je velmi tenká hranice a je vždy potřeba zohlednit celkové podmínky, ve kterých se rostlina nachází.

3.1 Syndrom toxicity amonného iontu

U rostlin dochází v případě nadbytečného příjmu a následné akumulace NH_4^+ v buňkách k jevu, který má své specifické projevy a označuje se jako syndrom toxicity amonného iontu. Mezi hlavní fenotypové projevy toxicity patří celkově zakrnělý růst a chloróza listů (viz obrázek č. 3) (Gerendás et al., 1997). Chloróza listů je samozřejmě úzce spjata s nízkým obsahem chlorofylu a nízkou účinností fotosyntézy. Zakrnělý kořenový systém může silně ovlivňovat příjem dalších důležitých živin.



Obrázek č. 3 – efekt nízké a vysoké koncentrace NH_4^+ na rostlinu ječmene setého v porovnání s NO_3^-

V případě 10 mM NH_4^+ vidíme typický příznak syndromu toxicity amonného iontu – zakrnělý růst kořenů i nadzemní části rostliny

Převzato z Britto and Kronzucker, 2002.

Syndrom toxicity amonného iontu je velmi intenzivně zkoumán, neboť už z názvu vyplývá, že se nejedná o záležitost, která by rostliny ovlivňovala pozitivním způsobem. V některých případech je tomuto syndromu ve spojitosti s dalšími okolnostmi dokonce přisuzováno lokální vymírání určitých druhů rostlin (de Graaf et al., 1998) či úbytek lesů (Van Dijk et al., 1989, 1990). Jak shrnují Britto and Kronzucker, 2002, obecně se uvádí, že projevy toxicity nastávají při externí koncentraci NH_4^+ nad 1 mM. Už jsem ale zmínila, že tato koncentrace se může u různých druhů rostlin lišit - pro některé rostliny bude tato koncentrace toxická, pro jiné ještě toxická nebude. Rostliny se tedy podle tolerance k NH_4^+ rozdělují na citlivé a tolerantní. Mezi rostliny citlivé patří např. ječmen setý (*Hordeum vulgare*) (Britto et al., 2001), jahodník (rod *Fragaria*) (Claussen and Lenz, 1999), nebo hořčice setá (*Sinapis alba* L.) (Mehrer and Mohr, 1989). Mezi rostliny tolerantní patří např. rýže setá (*Oryza sativa*), která

je známá pro svou obdivuhodnou toleranci k NH_4^+ (Wang et al., 1993b). Dobrým příkladem může být také borůvka chocholičnatá (*Vaccinium corymbosum* L.), která přirozeně roste v kyselějších půdách s nízkým pH, a tudíž je i dobře adaptována na vyšší obsah NH_4^+ (Claussen and Lenz, 1999)

V souvislosti s nadměrným příjmem a následnou toxicitou NH_4^+ hrají roli spíše nespecifické kanály. Vysokoafinitní přenašeče typu AMT jsou totiž většinou účinné při nízkých koncentracích NH_4^+ v půdě (viz kapitola 2.1.1). Transport velkého množství NH_4^+ mohou tedy zprostředkovat NSCC nebo KIRC (viz kapitola 2.1.2).

Pokud NH_4^+ zůstává volně v cytosolu v důsledku převýšení kapacity GS/GOGAT cyklu či neschopnosti přejít do vakuoly z důvodu koncentračního gradientu, začínají se u rostliny projevovat symptomy syndromu toxicity NH_4^+ .

3.1.1 Mechanismy toxicity NH_4^+

Při vystavení jednotlivých rostlinných druhů určitým koncentracím NH_4^+ bylo s ohledem na jejich citlivost vysledováno několik jevů. Tyto jevy související s nadbytkem NH_4^+ by mohly vysvětlovat, proč vůbec nastanou zmíněné fenotypové projevy. Mezi tyto jevy můžeme zařadit cyklování NH_4^+ přes plazmatické membrány, deficienci ostatních minerálních živin přijímaných ve formě kationtů, vyčerpání zásob sacharidů a karboxylových kyselin v kořenech, změny v extracelulárním pH apod.

Cyklování NH_4^+ přes plazmatické membrány

Velmi zásadní jev, který byl pozorován v souvislosti s nadměrným obsahem NH_4^+ , pochází ze studie Britto et al., 2001. Tato vědecká studie přišla s hypotézou toho, proč je hromadění NH_4^+ v buňkách pro rostlinu nepříznivé. Vědci podrobili měření dvě rostliny, rýži setou (*Oryza sativa*) a ječmen setý (*Hordeum vulgare*), lišící se svou citlivostí k NH_4^+ a vystavili je různým koncentracím tohoto iontu. Poté měřili výdej NH_4^+ společně s elektrochemickým potenciálem membrán. Zjistili, že se ječmen snaží přebytečný NH_4^+ vyloučit a že až 80% přijatého NH_4^+ je takto z buněk kořenů opět vyloučeno do rhizosféry. Bohužel však ječmen není schopen efektivně regulovat vtok NH_4^+ , tudíž jeho výdej nevede ke snížení koncentrace v buňce a rostlina se tak energeticky vyčerpává. Respirace kořenů za těchto podmínek narůstá až o 40%, což dokládá zvýšenou spotřebu energie. Autoři studie nazvali tento jev jako „futile transmembrane NH_4^+ cycling“, tzv. marné cyklování NH_4^+ přes membrány. V další práci stejného autorského kolektivu z roku 2013 se objevuje podrobnější rozebrání toho,

jestli se marného kolování přes membrány u ječmene účastní NH_4^+ nebo NH_3 . A měření ukazují spíše na NH_3 (Coskun et al., 2013a). Amoniak se v půdě většinou nenachází takové množství jako NH_4^+ , jelikož je protonován pomocí H^+ , které jsou přirozeně vylučovány kořeny do rhizosféry. Je ale schopen dostat se do buňky i prostou difúzí přes plazmatickou membránu, bez pomoci přenašečů či kanálů, což může přispívat k jeho akumulaci v buňce.

Indukovaná deficiencie minerálních živin

V řadě studií bylo zjištěno, že příjem NH_4^+ snižuje příjem ostatních minerálních živin, které jsou přijímány v podobě kationtů (především draslíku, vápníku a hořčíku).

a) deficiencie K^+

Při vysoké koncentraci NH_4^+ je velmi silně inhibován především příjem K^+ . Dochází zde totiž k přímé interferenci, kdy NH_4^+ využívá K^+ kanály k vlastnímu transportu, čímž není přijímán dostatek K^+ . Navíc tento transport skrze K^+ kanály není regulovatelný a může tak přispívat k syndromu toxicity NH_4^+ (Hoopen et al., 2010). Toto téma interference s K^+ na úrovni příjmu je podrobněji probráno v dalších kapitolách této práce (viz kapitola Interference NH_4^+ s K^+ výživou).

Pokud se rostlině zvýší dostupnost K^+ , fenotypové projevy syndromu se mohou velice zmírnit. V roce 2009 vyšla studie, ve které byla v tomto ohledu testována rýže setá (*Oryza sativa*). Rostliny byly kultivovány s pěti různými koncentracemi K^+ . Dusík byl dodán buď ve formě NH_4^+ v koncentraci 0,1 mM či 10 mM, nebo ve formě NO_3^- v koncentraci 10 mM. V případě rostlin kultivovaných s 10 mM NH_4^+ a 0,02 mM K^+ byly příznaky toxicity na první pohled patrné - jednalo se především o listovou chlorózu a snížení v čisté hmotnosti rostliny v důsledku redukce růstu. Už při zvýšení koncentrace K^+ na 0,1 mM došlo za stejné koncentrace NH_4^+ ke zvýšení čerstvé hmotnosti a ke zmírnění dalších projevů toxicity. K optimálnímu růstu rostliny došlo v případě NH_4^+ při koncentracích 10 mM NH_4^+ a 5 mM K^+ . V případě kontroly s NO_3^- nebyla za podmínek 0,02 mM K^+ a 10 mM NO_3^- pozorována ani listová chloróza, ani redukce růstu. To potvrzuje, že důvodem změny fenotypu není nízká koncentrace K^+ , ale právě vysoká koncentrace NH_4^+ . Co se týče vtoku a výtoku NH_4^+ , bylo provedeno měření pomocí značeného $^{13}\text{NH}_4^+$ opět za podmínek pěti různých koncentrací K^+ . Při nejnižší dávce 0,02 mM K^+ byly pozorovány nejvyšší hodnoty jak vtoku, tak výtoku NH_4^+ , které indikovaly toxické působení NH_4^+ . Při zvýšení na 0,1 mM K^+ došlo ke snížení hodnot vtoku a výtoku NH_4^+ . Celkový poměr mezi vtokem a výtokem (influx:efflux ratio) se z 0,87 při 0,02 mM K^+ snížil na 0,63 při 5 mM K^+ . Z těchto měření je patrné, že čím vyšší je dostupnost K^+ , tím méně NH_4^+ se

dostává do buněk, a ušetří se tím i energie na vylučování přebytečného NH_4^+ . Navíc tak dochází k doplnění K^+ jako esenciálního prvku (Balkos et al., 2009).

b) deficiencie Ca^{2+} a Mg^{2+}

Při akumulaci NH_4^+ dochází také ke snížení obsahu iontů Ca^{2+} a Mg^{2+} v pletivech listů i kořenů. Kromě toho, že tyto ionty mají své konkrétní fyziologické role - Ca^{2+} je významným sekundárním poslem v různých signálních kaskádách a Mg^{2+} je důležitá součást chlorofylu, při jejich nedostatku také dochází k narušení iontové rovnováhy v buňce. V rostlinách okurky seté (*Cucumis sativus L.*) došlo k akumulaci NH_4^+ v okamžiku, kdy jeho koncentrace v růstovém médiu dosáhla 1 mM. Tato rostlina se tímto řadí mezi NH_4^+ -citlivé druhy (Roosta and Schjoerring, 2007). Deficiencie zmíněných prvků nastala ale pouze v případě, kdy byl NH_4^+ jediným zdrojem dusíku. V případě rostlin pěstovaných za přítomnosti NO_3^- jako hlavního zdroje dusíku nebyl při přidání 1 mM NH_4^+ výše uvedený problém indikován. Tímto se jen potvrzuje, že negativní odpověď rostliny na NH_4^+ nezáleží pouze na jeho koncentraci, ale také na dostupnosti ostatních živin (Roosta and Schjoerring, 2007).

Vyčerpání uhlíkatých látek v kořenech

Další studie ukazují, že existuje vztah mezi nadměrnou asimilací NH_4^+ a vyčerpáním uhlíkatých látek v kořenech. Zpracování nadbytečného NH_4^+ totiž vyžaduje velké množství sacharidů a karboxylových kyselin, ze kterých je získávána energie a zároveň slouží jako látky, na které je NH_4^+ navazován. Pokud dojde k jejich vyčerpání, zpracování NH_4^+ je nedostatečné (Roosta and Schjoerring, 2008). Na rostlinách rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum Mill.*) bylo dokázáno, že po přidání 2-oxoglutarátu, který je významným substrátem asimilace NH_4^+ a zdrojem uhlíku, dochází k nárůstu zmíněné asimilace a zmírnění toxicity (Magalhaes et al., 1992). Při velké spotřebě uhlíkatých sloučenin navíc dochází k odchýlkám v C/N poměru (Ariz et al., 2013). Toxicita může být v tomto případě zmírněna vyšší ozářeností, čímž se stimuluje fotosyntéza, optimalizuje dostupnost uhlíku a C/N poměr. Na rostlinách hrachu setého (*Pisum sativum*) byl proveden experiment související právě s ozářeností. Rostliny byly pěstovány buď za nízké intenzity ozáření ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosynteticky aktivní radiace) nebo za vysoké intenzity ozáření ($750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosynteticky aktivní radiace) a zdrojem dusíku byl v obou případech pouze NH_4^+ . Pokud se obsah NH_4^+ pohyboval v rozmezí 2,5-10 mM, došlo při vysoké ozářenosti k posílení tolerance vůči NH_4^+ a zmírnění toxicity, na rozdíl od případu nízké ozářenosti. Vysoká ozářenost v tomto případě zajistí účinnější fotosyntézu, která obnoví dostupnost uhlíkatých sloučenin, ze kterých je získávána energie. Tato energie je

pravděpodobně využita k udržení nízkých koncentrací NH_4^+ v buňkách (Ariz et al., 2011). Dostupnost uhlíku se tedy jeví jako další faktor ovlivňující možnou toxicitu NH_4^+ .

Změny v pH

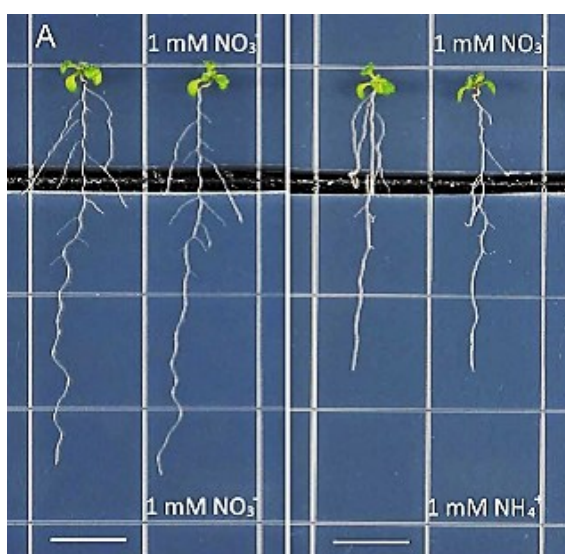
Jiné studie ukazují, že při nadměrném příjmu NH_4^+ může docházet také ke změnám v pH. Tato skutečnost souvisí s tím, že při příjmu NH_4^+ dochází k vylučování H^+ , což způsobuje okyselování rhizosféry (Schubert and Yan, 1997). Toto okyselování může souviset se zapojením K^+ kanálů v příjmu NH_4^+ . U rostlin *Arabidopsis* bylo pozorováno, že výdej H^+ je nejvyšší v přítomnosti obou iontů (K^+ i NH_4^+) a lze jej snížit aplikací TEA^+ , což je specifický inhibitor K^+ kanálů. Přesný mechanismus ale zůstává nejasný (Hoopen et al., 2010). Co se týče kyselého prostředí půdy, už v roce 1991 bylo poukázáno na to, že při nižším pH rhizosféry (pH=4,5) jsou změny v růstu rostlin živených na NH_4^+ daleko výraznější než při vyšších hodnotách pH (pH=6) (Chaillou et al., 1991). Nejnovější studie tento poznatek jen potvrzují. Rostliny *Arabidopsis* pěstované na médiu s 20 mM NH_4^+ vykazovaly při pH=5,7 zakrnělý růst prýtu i kořenového systému. Po změně pH na neutrální hodnotu (pH=7) došlo za jinak stejných podmínek ke zmírnění inhibice růstu, což dokazuje, že toxicita amonného iontu úzce souvisí s okolním pH (Zheng et al., 2015). Optimalizovat okolní pH může např. přidání NO_3^- do média, protože při jeho příjmu dochází zároveň k příjmu H^+ , čímž může dojít ke zvyšování pH k neutrálnějším hodnotám (McClure et al., 1990).

3.2 Reakce kořenového systému na NH_4^+

NH_4^+ není důležitý jen z hlediska výživy, ale také jako signál, který reguluje růst rostliny. I kořenový systém, který jako první přichází do kontaktu s NH_4^+ , vykazuje určité morfologické změny, které jsou přisuzovány právě přítomnosti NH_4^+ . Změny mohou často při vysokých koncentracích souviset s toxickým působením NH_4^+ , ale ne všechny odezvy jsou negativní. Opět velmi záleží na ostatních podmínkách prostředí, např. na přítomnosti NO_3^- .

Růst kořenů je založen na procesech dělení a prodlužování buněk. Ve studii Li et al., 2010 se uvádí, že při výživě NH_4^+ jako samostatným zdrojem dusíku může dojít u rostlin *Arabidopsis thaliana* k blokaci prodlužování kořenů, které souvisí především s inhibicí růstu buněk. O pár let později se další vědci zabývali stejným druhem rostliny a opět zkoumali vliv NH_4^+ na prodlužování kořenů. Rostliny byly pěstovány na agarovém médiu, které bylo rozděleno do dvou vrstev - horní vrstva obsahovala 1 mM KNO_3 jako zdroj NO_3^- , spodní vrstva obsahovala 1 mM NH_4Cl jako zdroj NH_4^+ . Spodní vrstva navíc obsahovala 1 mM KCl , aby byl

zachován stejný obsah K^+ v obou vrstvách. Tímto rozdělením byla iontu NH_4^+ vystavena pouze apikální část kořene, čímž se snížila možnost, že by výsledky experimentu ovlivnila toxicita amonného iontu na nadzemní část rostliny. Podle jejich výsledků je NH_4^+ schopný inhibovat prodlužování kořenů tím, že redukuje oba dva zmíněné buněčné procesy, buněčné dělení i elongaci buněk. Už po 5 dnech byl ve srovnání s kontrolou počet buněk v meristematické zóně kořene o 40% nižší, snížila se celková délka apikálního kořenového meristému i jeho dělivá aktivita. Navíc maximální růst buněk se v případě NH_4^+ snížil o 22%. Jak je vidět na obrázku č. 4, v případě NH_4^+ nedošlo k takové elongaci primárního kořene jako v případě kontroly s NO_3^- v obou segmentech agaru (Liu et al., 2013).



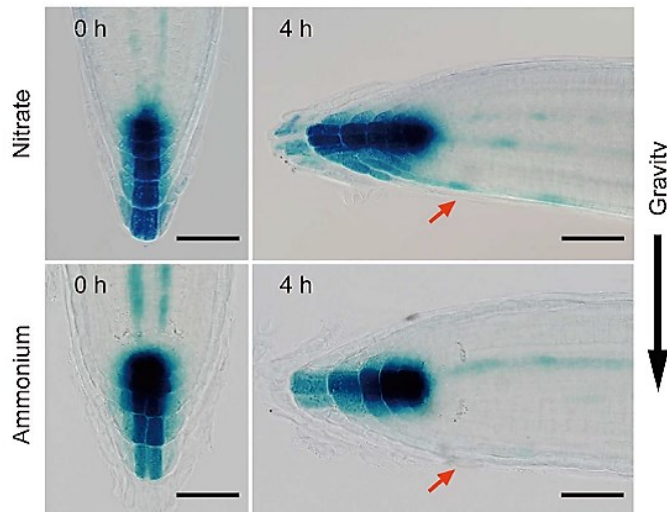
Obrázek č. 4 – inhibice růstu primárního kořene v důsledku přítomnosti 1 mM NH_4^+ u *Arabidopsis*

1 mM NH_4^+ fungoval jako inhibitor prodlužování primárního kořene, protože redukoval elongaci buněk i dělení buněk v apikálním kořenovém meristému.

Převzato z Liu et al., 2013.

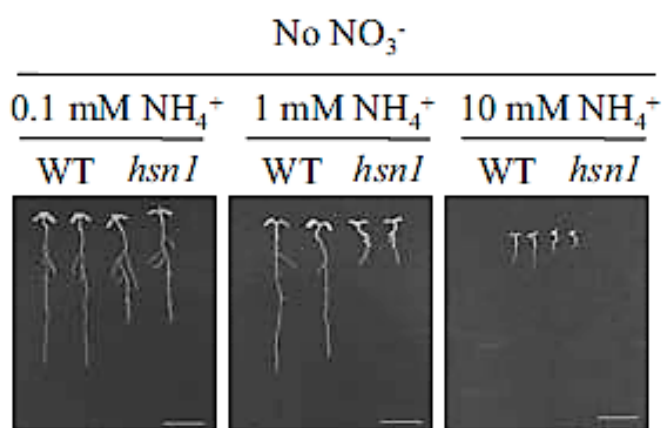
Ve stejné studii bylo také pozorováno, že kořen vystavený 1 mM NH_4^+ vykazoval změny v gravitropní odpovědi. Došlo ke snížení rychlosti ohybu a konečný úhel ohybu se taktéž změnil. Byla proto sledována distribuce auxinu v kořenové špičce pomocí rostlin nesoucích konstrukt DR5::GUS (β -glukuronidáza spolu s auxin responsivním promotorem). Auxin je fytohormon, jehož distribuce se významně podílí na gravitropických pohybech kořene. Pro gravitropní reakci kořene je nezbytný jeho přesun do spodní části kořenové špičky, kde inhibuje růst buněk, způsobí nesymetrický růst a ohyb kořene ve směru působení gravitačního stimulu (Swarup et al., 2005). Ve vertikální poloze kořene byla pozorována symetrická distribuce auxinu uprostřed kořenové špičky jak v případě vystavení NO_3^- , tak v případě NH_4^+ (viz obrázek č. 5). Po změně polohy o 90° došlo u kontroly s NO_3^- k asymetrické redistribuci auxinu – hromadil se na spodní straně kořenové špičky a došlo tak k ohýbání kořene. U rostlin, které byly pěstovány na médiu s NH_4^+ , se ale distribuce auxinu ve špičce kořenů po jejich otočení do

horizontální polohy nezměnila a zůstala víceméně symetrická (viz obrázek č. 5). Pro podrobnější vyjasnění mechanismu byla analyzována míra exprese genů kódujících auxinové transportéry. Výsledky ukázaly, že NH_4^+ výrazně snižuje expresi genů *AUX1* (z angl. auxin transporter protein 1) a *PIN2* (z angl. pin-formed 2), které kódují transportéry klíčové při redistribuci auxinu v kořenové špičce. Z výsledků tedy vyplývá, že za určitých podmínek může NH_4^+ výrazně měnit transport auxinu a ovlivňovat tak gravitropické pohyby (Liu et al., 2013).



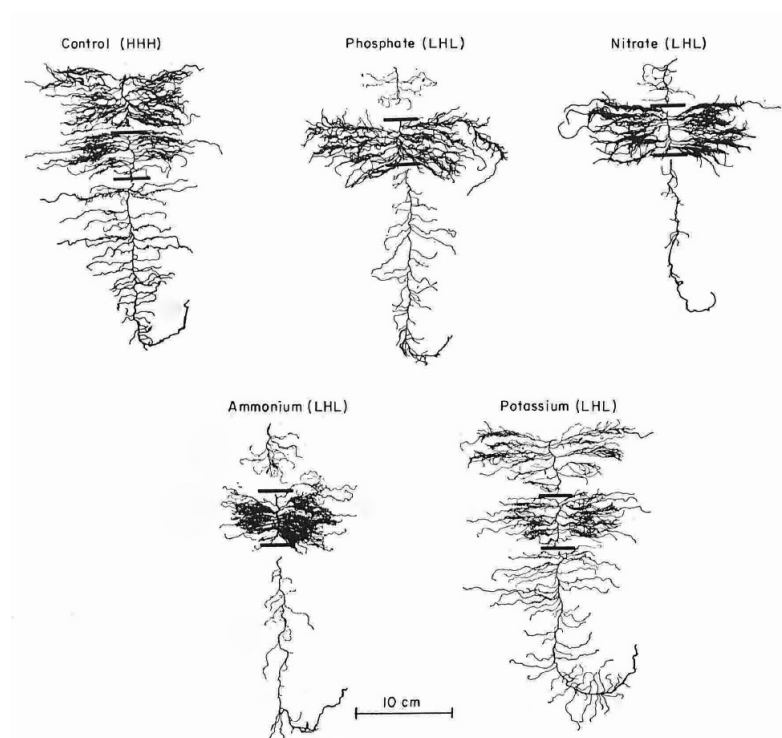
Obrázek č. 5 – vizualizace auxinových maxim ve špičce kořene (u rostlin *Arabidopsis* s konstruktem DR5::GUS) při změně polohy kořene o 90° za podmínek NO_3^- nebo NH_4^+ výživy
Převzato z Liu et al., 2013.

Inhibice růstu kořenů je přisuzována i tomu, že NH_4^+ má přímý vliv na aktivitu enzymu, který se nazývá GMPáza (GDP-manózapyrofosforyláza). Tento enzym zajišťuje syntézu GDP-manózy, která je významná při syntéze kyseliny askorbové či při N-glykosylaci proteinů. Bylo zjištěno, že aktivita GMPázy se v kořenech normálních rostlin *Arabidopsis thaliana* snižuje právě v důsledku vystavení vysokým koncentracím NH_4^+ (Qin et al., 2008). Ve studii Qin et al., 2008 hledali v populaci chemicky mutagenizovaných semenáčků rostliny hypersenzitivní k přítomnosti NH_4^+ . Nalezený mutant *hsn1* (z angl. hypersensitive to NH_4^+ 1) nese bodovou mutaci právě v genu pro GMPázu (dochází k záměně Gly za Ser na pozici 11) a vykazuje sníženou aktivitu tohoto enzymu oproti rostlinám divokého typu. U *hsn1* mutantních rostlin pak dochází ke zkrácení primárního kořene a k celkovému poškození růstu rostliny, které bylo patrné především za přítomnosti NH_4^+ v kultivačním médiu, navíc při koncentraci 10 mM NH_4^+ bylo výraznější než při koncentraci 1 mM NH_4^+ (viz obrázek č. 6). Tím, že gen pro GMPázu není plně funkční, nemůže docházet k syntéze GDP-manózy a kyseliny askorbové, ani k N-glykosylaci proteinů ve správném rozsahu. Defekt v N-glykosylaci proteinů je pravděpodobně tím mechanismem, který zprostředkovává hypersenzitivitu k NH_4^+ a způsobí popsané fenotypové projevy. Aktivita GMPázy je tedy velmi důležitá v citlivosti k NH_4^+ .



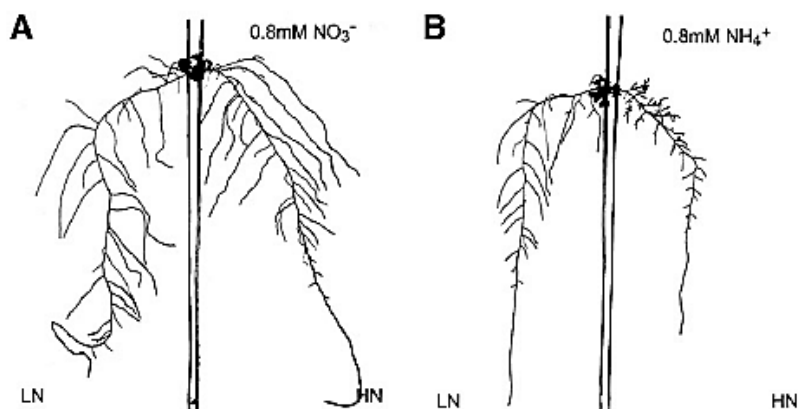
Obrázek č. 6 – srovnání fenotypů WT (wild-type, rostliny divokého genotypu) rostlin a *hsn1* (hypersensitive to NH₄⁺) mutantních rostlin *Arabidopsis* při různých koncentracích NH₄⁺ bez dostupnosti NO₃⁻. Snížená (u WT) či potlačená (u *hsn1*) aktivita GMPázy se projevuje inhibicí elongace primárního kořene. Převzato z Qin et al., 2008.

NH₄⁺ může ale vyvolat i pozitivní růstové odezvy kořenového systému. V případě, že se rostlina nachází v podmínkách nedostatku dusíku, můžeme po přidání NH₄⁺ do určitého místa v okolí kořenového systému pozorovat pozitivní odpověď ve smyslu lokální stimulace růstu postranních kořenů za účelem získat přítomný zdroj dusíku. Konkrétně se u NH₄⁺ jedná především o stimulaci větvení postranních kořenů (Lima et al., 2010), naopak zvýšená elongace postranních kořenů je typická pro lokalizovanou odpověď na přítomnost NO₃⁻ (Krouk et al., 2010). Už ve studii z roku 1975 bylo na rostlinách ječmene dokázáno, že vývoj kořenového systému výrazně závisí na přítomnosti NH₄⁺. Oblast kořenového systému, která byla vystavena nedostatku NH₄⁺, měla velmi málo postranních kořenů narozdíl od kontroly, která byla vystavena kompletní výživě i s NH₄⁺ (viz obrázek č. 7). Toto indikovalo, že NH₄⁺ musí být nějak důležitý při tvorbě postranních kořenů (Drew, 1975). Zůstala nicméně otázka, co je senzorem lokálně vyšší dostupnosti daného iontu. Pro NO₃⁻ byla v této souvislosti odhalena funkce vysokoafinitního nitrátového transportéru NRT1;1 (z angl. nitrate transporter 1;1), který kromě příjmu NO₃⁻ funguje jako senzor pro vnímání NO₃⁻ a zprostředkovává tak elongaci kořenů v NO₃⁻ bohaté oblasti půdy (Krouk et al., 2010; Remans et al., 2006). Takovýto protein fungující zároveň jako transportér a receptor je nazýván jako transeptor (Lanquar et al., 2009). Na základě možné analogie ve vnímání NH₄⁺ prováděli Lima et al., 2010 experimenty s celou řadou inzerčních mutantů *Arabidopsis thaliana* nesoucích inzerci ve vybraných genech AMT1 rodiny vysokoafinitních transportérů pro NH₄⁺. Lokalizovaná odpověď kořenového systému byla oproti rostlinám divokého typu potlačena především v mutantovi *qko* (mutantní ve čtyřech genech *AMT1;1*, *AMT1;2*, *AMT1;3* a *AMT2;1*) a v jednoduchém mutantovi *amt1;3*. Po rekonstituci genu *AMT1;3* v *qko* i v *amt1;3* došlo v porovnání s ostatními geny k obnově lokalizované odpovědi ve smyslu vývoje postranních kořenů. Z tohoto důvodu je AtAMT1;3



Obrázek č. 7 – lokalizovaná růstová odpověď kořenového systému na dostupnost živin
 Kořeny ječmene setého byly z hlediska výživy rozděleny na 3 zóny – prostřední zóna je vždy vyživena kompletně, vrchní a spodní zóna je vždy deficientní v živině, která je uvedena nahoře.
 Převzato z Drew, 1975.

pravděpodobně hlavním hráčem při lokalizované odpovědi kořenového systému na NH_4^+ . Nemá pouze funkci vysokoafinitního transportéru, nýbrž i funkci receptoru, který je schopen vnímat NH_4^+ a stojí tak na počátku signální dráhy, která vede ke stimulaci větvení postranních kořenů (Lima et al., 2010). Na obrázku č. 8 je vidět, že stejná koncentrace odlišných zdrojů dusíku (NH_4^+ a NO_3^-) má na postranní kořeny rozdílný vliv.



Obrázek č. 8 - srovnání růstu postranních kořenů *Arabidopsis* při výživě 0,8 mM NO_3^- nebo 0,8 mM NH_4^+
 U NO_3^- je patrné prodlužování p. kořenů, u NH_4^+ naopak zakládání nových p. kořenů.
 LN – low nitrogen; HN – high nitrogen
 Převzato z Lima et al., 2010.

NH_4^+ může ovlivnit i tvorbu a elongaci kořenových vlásků. Klíčovou roli hraje opět jeho koncentrace. Rostliny *Arabidopsis* byly pěstovány na médiích, která obsahovala různé zdroje dusíku (NH_4Cl , NH_4NO_3 , KNO_3) v různých koncentracích (od 1,25 mM do 20 mM). Přítomnost 10 mM nebo 20 mM KNO_3 měla na tvorbu kořenových vlásků minimální vliv, naopak v přítomnosti 10 mM nebo 20 mM NH_4Cl nebo NH_4NO_3 byla pozorována tvorba většího množství kořenových vlásků. To indikovalo, že NH_4^+ je v případě tvorby vlásků důležitější než NO_3^- . Poté byly rostliny pěstovány za přítomnosti NH_4NO_3 , tudíž v přítomnosti obou zdrojů dusíku. Ve vztahu ke koncentraci NH_4^+ bylo zjištěno, že čím vyšší je jeho koncentrace, tím více kořenových vlásků se tvoří. Při 20 mM NH_4^+ došlo k desetkrát vyšší tvorbě vlásků než při 1,25 mM NH_4^+ , kdy došlo jen k třikrát vyšší tvorbě vlásků. Ovšem délka kořenových vlásků byla při vysoké koncentraci NH_4^+ značně redukována. Při 20 mM NH_4^+ došlo ke zkrácení vlásků až o 40% a při koncentraci 1,25 mM došlo ke zkrácení jen o 18% oproti rostlinám pěstovaných při samotném NO_3^- . Tady tedy platí, že čím vyšší je koncentrace NH_4^+ , tím kratší kořenové vlásky jsou. Vyšší koncentrace NH_4^+ v přítomnosti NO_3^- tedy stimuluje tvorbu kořenových vlásků, ale zároveň redukuje jejich délku (Yang et al., 2011).

Později byly pozorovány 3 ekotypy *Arabidopsis* (Col-0, Tsu-0 a Sha) z hlediska působení NH_4^+ na kořenové vlásky. Opět byly použity různé zdroje dusíku ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , KNO_3). Velmi citlivým k NH_4^+ byl ekotyp Sha, u kterého byl při 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inhibován vývoj kořenových vlásků v porovnání s oběma dalšími ekotypy. Naopak, ekotyp Col-0 vytvářel nejkratší kořenové vlásky s nejnižší denzitou v přítomnosti NH_4NO_3 nebo KNO_3 . Je proto pravděpodobně, že odpověď na NH_4^+ souvisí s jednotlivými genotypy ekotypů *Arabidopsis* (Vatter et al., 2015). Poté byl právě ekotyp Col-0, který měl nejkratší kořenové vlásky v přítomnosti NO_3^- , pěstován v médiu s různými koncentracemi NH_4Cl . Bylo zjištěno, že největší stimulace prodlužování kořenových vlásků nastává při nejnižší koncentraci NH_4^+ , a to při 0,01 mM. Během 3 dnů se kořenové vlásky prodloužily o 73% v porovnání s 5 mM NH_4^+ . To naznačuje, že čím nižší koncentrace NH_4^+ , o to více se kořenové vlásky prodlouží. U kontroly s 5 mM NO_3^- nedošlo k tak výraznému prodlužování kořenových vlásků jako v přítomnosti nízké koncentrace NH_4^+ . Prodlužování kořenových vlásků může tedy efektivněji regulovat spíše NH_4^+ , ale záleží na jeho koncentraci (Zhu et al., 2016).

4. Interference NH_4^+ s K^+ výživou

Už v předchozí kapitole o syndromu toxicity amonného iontu jsem zmínila, že vyšší koncentrace NH_4^+ mají negativní vliv na příjem K^+ . Právě jednou z možností, proč je NH_4^+ ve

vyšší dávce toxický, je skutečnost, že snižuje příjem a následně i obsah K^+ v buňkách i v pletivech, což má negativní dopad na celkový růst rostliny (Szczerba et al., 2008a). Vzhledem k tomu, že zvyšující se koncentrace K^+ dokáže zmírnit projevy vyšších koncentrací NH_4^+ (Balkos et al., 2009), je jisté, že NH_4^+ a K^+ mezi sebou nějakým způsobem interagují. Draslík je prvek, který se podobně jako dusík, řadí mezi nejdůležitější rostlinou přijímané prvky. Podílí se nejen na udržování membránového potenciálu, otevírání a uzavírání průduchů nebo na osmoregulaci buněk, ale je také schopný navozovat konformační změny proteinů, čímž může výrazně regulovat aktivitu některých enzymů (Marschner, 2011). Nyní se pokusím problematiku interference NH_4^+ a K^+ více přiblížit.

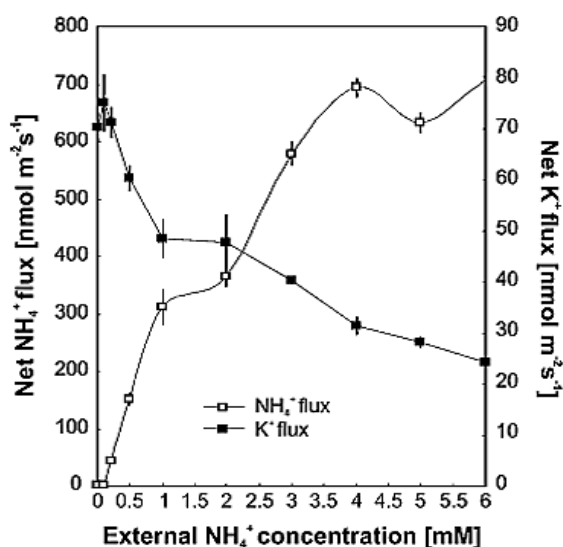
4.1 Příjem K^+

Pro příjem K^+ existují specifické přenašeče, ale i kanály, které se rozdělují z hlediska účinnosti na HATS a LATS, stejně jako u příjmu NH_4^+ (Epstein et al., 1963). Co se týče transportérů zajišťujících sekundární aktivní transport K^+ , najdeme je např. v rodině proteinů KUP/HAK/KT (z angl. K^+ uptake/high affinity K^+/K^+ transport), která zprostředkovává především vysokoafinitní transport K^+ (Santa-María et al., 1997). Dále existují pasivní K^+ kanály, které zprostředkovávají nízkoafinitní transport K^+ , a patří sem např. KIRC (Maathuis and Sanders, 1995). U některých transportérů a kanálů bylo dokonce pozorováno, že mohou „přepínat“ mezi nízkoafinitním a vysokoafinitním transportem K^+ a fungovat tedy dvojitým způsobem. Příkladem transportéru, který funguje jak za nízkých, tak za vysokých koncentrací K^+ v půdě, může být AtKUP1 (z angl. *Arabidopsis thaliana* K^+ uptake 1), který je sice řazen mezi HATS, ale svou funkci dokázal plnit i při vysokých 20 mM K^+ (Fu and Luan, 1998). Stejně tak i kanál AtAKT1 (z angl. *Arabidopsis* K^+ transport channel), který je klasifikován jako LATS, dokáže přijímat K^+ i při nízké externí koncentraci 10 μ M K^+ (Hirsch, 1998). Tato duální afinita AtAKT1 může být velice důležitá při příjmu K^+ především z toho důvodu, že některé vysokoafinitní transportéry pro K^+ , jako je např. AtHAK5 (z angl. *Arabidopsis thaliana* high affinity K^+ 5), mohou být za určitých podmínek silně inhibovány (Zhang et al., 2010). Na modelu *Arabidopsis thaliana* jsou z hlediska příjmu za podmínek nízkých koncentrací K^+ za nejdůležitější považovány právě transportér AtHAK5 a kanál AtAKT1 (Aleman et al., 2011). Při nedostatku K^+ dochází k regulaci vysokoafinitního transportéru AtHAK5, kdy dochází k indukci jeho transkripce (Rubio et al., 2014).

4.2 Interference NH_4^+ s K^+ na úrovni příjmu a výdeje

4.2.1 Úroveň příjmu

Důležitým poznatkem v interakci NH_4^+ a K^+ je skutečnost, že vtok NH_4^+ může být v případě jeho vyšších koncentrací zprostředkován nízkoafinitními K^+ kanály a tím může docházet k inhibici příjmu K^+ (Wang et al., 1996). K potvrzení, zda K^+ kanály opravdu zprostředkovávají příjem NH_4^+ , byly např. ve studii Hoopen et al., 2010 použity dva specifické inhibitory těchto kanálů – TEA^+ (tetraethylammonium) a Gd^{3+} (gadolinium). Nejdříve byly rostliny vystaveny vysokým koncentracím NH_4^+ , kdy došlo k akumulaci NH_4^+ v buňkách a inhibici růstu kořenů, což jsou typické projevy pro vysoké koncentrace NH_4^+ . Ovšem po aplikaci inhibitorů bylo za stejných podmínek změřeno snížení vtoku NH_4^+ a zároveň došlo ke zmírnění inhibice růstu kořenů. Když se po aplikaci inhibitorů pro K^+ kanály snížil vtok NH_4^+ , je velmi pravděpodobné, že NH_4^+ je opravdu přijímán skrze tyto kanály. Tento jev je způsoben především podobností mezi oběma ionty – mají stejný náboj a podobnou velikost, tudíž ne zcela specifické kanály mohou zprostředkovat průchod obou těchto iontů přes plazmatickou membránu. Z této studie je navíc patrné, že K^+ a NH_4^+ mezi sebou při příjmu skrze K^+ kanály soutěží. Za stálé koncentrace 0,2 mM K^+ a měnící se koncentrace NH_4^+ byly měřeny toky obou iontů přes plazmatické membrány kořenových buněk. Jak je vidět na obrázku č. 9, zvyšující se koncentrace NH_4^+ snižovala tok K^+ a zvyšovala tok NH_4^+ . Velké množství NH_4^+ tedy může inhibovat příjem K^+ už jen na úrovni toho, že obsazuje kanály primárně určené pro K^+ .



Obrázek č. 9 – vliv externí koncentrace NH_4^+ na toky NH_4^+ a K^+

Při zvyšování externí koncentrace NH_4^+ dochází ke snižování toku K^+ přes membránu a ke zvyšování toku NH_4^+ přes membránu.

Převzato z Hoopen et al., 2010.

Ve vztahu k příjmu NH_4^+ skrze K^+ kanály se vědci ve stejné studii (Hoopen et al., 2010) také snažili zjistit, jestli je konkrétně kanál AtAKT1 schopný transportovat NH_4^+ a jestli by transport nemohly zprostředkovávat i vysokoafinitní transportéry. K testování byly použity

kvasinky s mutacemi v jednotlivých genech pro transportéry NH_4^+ nebo K^+ . Mutant *Δmep1-3* byl nefunkční v genech *MEP1*, *MEP2* a *MEP3* (z angl. methylammonium permease), které kódují transportéry pro NH_4^+ . Mutant *Δtrk1,2* byl nefunkční v genech *TRK1* a *TRK2* (z angl. transport of K^+), které kódují transportéry pro K^+ . Poslední mutant *Δmep1-3Δtrk1,2* byl nefunkční ve všech pěti zmíněných genech. Takto defektní kvasinkoví mutanti byli komplementováni geny pro různé K^+ transportéry z ječmene nebo *Arabidopsis* a následně rostli při různých hodnotách pH a odlišných koncentracích NH_4^+ a K^+ . Z výsledků tohoto experimentu je patrné, že kanál AtAKT1, ale i transportéry AtHAK5 a HvHKT2;1 (z angl. *Hordeum vulgare* high affinity K^+ transporter) mohou transportovat NH_4^+ . Ovšem ne všechny jsou toho schopny ve stejné míře. Transportér AtHAK5 je transportu NH_4^+ schopen v daleko menším rozsahu, než AtAKT1 (Hoopen et al., 2010).

V důsledku inhibice na úrovni příjmu dochází i ke snížení obsahu K^+ v rostlině, jak už bylo zmíněno v kapitole 3.1.1. Potvrdili to např. vědci v roce 2008, kdy bylo na rýži seté kromě redukce příjmu K^+ popsáno také snížení translokace K^+ z kořenů do ostatních částí rostliny a snížený obsah K^+ v buňkách i v pletivech. Všechny toky a obsahy byly měřeny pomocí radioaktivně značených $^{42}\text{K}^+$ a $^{13}\text{NH}_4^+$. NH_4^+ byl použit jako hlavní zdroj dusíku v koncentraci 10 mM a pro simulaci vysokoafinitního a nízkoafinitního transportu K^+ byly použity koncentrace K^+ od 0,02 mM do 40 mM. Ve srovnání s kontrolou, kde byl použit jako hlavní zdroj dusíku NO_3^- , došlo při 0,02 mM K^+ a 10 mM NH_4^+ k redukci příjmu K^+ zhruba o 60%, k redukci růstu rostliny až o 50% a ke snížení obsahu K^+ v kořenech i v nadzemní části rostliny. Při zvýšení koncentrace K^+ na 1,5 mM došlo k výraznému posílení jak příjmu a obsahu K^+ , tak růstu rostliny. Výsledky této studie poukazují na skutečnost, že pokud je K^+ v kultivačním roztoku přítomný v nižších koncentracích (0,02 mM), je pak příjem K^+ inhibován vysokou koncentrací NH_4^+ ve větší míře. To naznačuje, že inhibice příjmu K^+ není způsobena jen výše popsanou kompeticí mezi NH_4^+ a K^+ při vstupu skrze nízkoafinitní K^+ kanály, ale musí být ovlivněny i vysokoafinitní transportéry pro K^+ . Při koncentraci 1,5 mM K^+ by se měl v příjmu zapojit spíše nízkoafinitní systém a ten by podle těchto výsledků nemusel být tak citlivý k působení NH_4^+ , jako vysokoafinitní systém (Szczzerba et al., 2008a). Tuto myšlenku citlivosti vysokoafinitního systému k NH_4^+ podporují i předchozí studie prováděné na rostlinách ječmene, kde byl za nízké externí koncentrace K^+ příjem tohoto iontu nižší v rostlinách pěstovaných při 10 mM NH_4^+ ve srovnání s rostlinami pěstovanými při 10 mM NO_3^- . Z toho vyplývá, že NH_4^+ silně ovlivňuje vysokoafinitní systém pro příjem K^+ (Kronzucker et al., 2003; Szczzerba et al., 2006).

Za účelem porozumění mechanismu, jak NH_4^+ ovlivňuje vysokoafinitní transportéry, byla v roce 2008 testována interakce mezi NH_4^+ a expresí genu pro transportér AtHAK5 ve srovnání s expresí genu pro kanál AtAKT1 v závislosti na K^+ . Výsledky ukázaly, že v normálních rostlinách *Arabidopsis* je při nedostatku K^+ a nepřítomnosti NH_4^+ v médiu exprimován AtHAK5 i AtAKT1. Ovšem pokud je v médiu nedostatek K^+ a je přítomen NH_4^+ , a to i v koncentraci 100 μM , je exprese genu AtHAK5 potlačena a aktivní zůstává pouze kanál AtAKT1, jehož genová exprese sice není úplně beze změny, ale ve srovnání s genem AtHAK5 je exprese genu AtAKT1 k působení NH_4^+ méně citlivá. Kanál AtAKT1 je schopen přijímat K^+ i při nízkých koncentracích a nahrazuje tak částečně funkci AtHAK5, který je na transkripční úrovni inhibován (Rubio et al., 2008). Tato inhibice AtHAK5 byla prokázána i v další nezávislé studii zaměřené na interakci mezi K^+ a Cs^+ . Cs^+ je na základě podobnosti s K^+ schopný být transportován skrze K^+ transportéry. Za podmínek nedostatku K^+ byly přidány 2 mM NH_4^+ , což způsobilo snížení příjmu Cs^+ v důsledku snížení transkripce genu AtHAK5 (Qi et al., 2008). Vědci tedy potvrdili, že NH_4^+ inhibuje vysokoafinitní systém pro příjem K^+ .

Interference mezi NH_4^+ a K^+ se nicméně jeví jako komplexní záležitost a ne všechno, co je zjištěno na modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*, musí ve stejném rozsahu fungovat i u ostatních druhů rostlin. Dokládá to studie, ve které byly *Arabidopsis* i ječmen pěstovány v médiu s vyšší koncentrací NH_4^+ (2 mM nebo 10 mM s ohledem na citlivost každého druhu) a při třech různých koncentracích K^+ (0,0225 mM, 0,1125 mM a 5 mM). Vyšší koncentrace NH_4^+ jim umožnila testovat nízkoafinitní K^+ kanály, neboť už věděli, že NH_4^+ inhibuje vysokoafinitní transportéry. V rostlinách *Arabidopsis* divokého typu byla při koncentraci 0,0225 mM K^+ po aplikaci TEA^+ a Ba^{2+} (inhibitory K^+ kanálů) pozorována blokáce příjmu K^+ . Tento výsledek vypovídá o tom, že u *Arabidopsis* došlo k NH_4^+ -indukované inhibici vysokoafinitních transportérů a že kanál AtAKT1, který se zapojuje při příjmu K^+ i za jeho nízkých koncentrací (Hirsch, 1998), je blokován specifickými inhibitory. Naopak u ječmene neměly za jinak stejných podmínek inhibitory TEA^+ ani Ba^{2+} vliv na příjem K^+ . Tudíž to vypadá, že u ječmene nedochází za takto nízkých koncentrací K^+ k příjmu pomocí AKT1 jako u *Arabidopsis*. Předpokládají tedy, že vysokoafinitní systém pro příjem K^+ u ječmene není zcela inhibován jako u *Arabidopsis*, a uplatňuje se při příjmu v nízkých koncentracích K^+ i za přítomnosti NH_4^+ . U ječmene by se pravděpodobně mohl zapojovat homolog k AtHAK5, a to HvHAK1 (z angl. *Hordeum vulgare* high affinity K^+ 1), který je podobně jako AtHAK5 citlivý k působení NH_4^+ (Santa-María et al., 1997), ale zřejmě ne ve zcela stejném rozsahu jako AtHAK5 u *Arabidopsis*. V této studii však zapojení HvHAK1 nebylo nijak testováno. Nabízí

se tedy i možnost, že existuje nějaký dosud neznámý transportér příjmu K^+ , který pracuje v ječmeni za nízkých koncentrací K^+ (Coskun et al., 2013b).

4.2.2 Úroveň výdeje

Působení NH_4^+ nesouvisí jen s inhibicí příjmu K^+ , ale souvisí i se zvýšeným výdejem K^+ . Obecně je K^+ v rostlině velmi pohyblivým iontem a dochází k jeho pohybu přes membrány v obou směrech, což je důležité pro jeho funkce (Marschner, 2011). Mezi kanály, které zprostředkovávají výdej K^+ , patří např. GORK (z angl. guard cell outward rectifying K^+ channel), který je přítomen ve svěracích buňkách průduchů (guard cells), ale také v kořenových vláscích (Ivashikina et al., 2001).

Ke zjištění, zda NH_4^+ ovlivňuje i výdej K^+ , byl použit radioaktivně značený $^{42}K^+$. Výdej K^+ z kořenových buněk byl pozorován po aplikaci 10 mM NH_4^+ , zatímco přítomnost stejné koncentrace NO_3^- vyvolala opačný efekt. Za externí koncentrace 0,1 mM a 1 mM K^+ byl pozorován mnohem rychlejší výdej K^+ než bez aplikace NH_4^+ . Pravděpodobným mechanismem, proč při použití NH_4^+ dojde k zesílení výdeje K^+ , je depolarizace membrány, která zesílí aktivitu GORK. K depolarizaci totiž dochází i při použití metabolických inhibitorů VO_4^{3-} a CN^- , které stejně jako NH_4^+ zvyšují výdej K^+ (Lew, 1991). Opačný efekt byl pozorován po použití HCO_3^- , který hyperpolarizuje membránu a tím snížil výdej K^+ (Poole, 1969). Takže NH_4^+ pravděpodobně nepřímou, skrze změny membránového potenciálu, ovlivňuje kanály typu GORK, které zvyšují svoji aktivitu (Coskun et al., 2010).

Efekt zvýšeného výdeje K^+ po aplikaci NH_4^+ byl potvrzen v již zmíněné studii z roku 2013 Coskunem a spoluautory. Navíc bylo testováno, co se stane u rostlin ječmene po odstranění NH_4^+ z média. Po jeho odstranění došlo až k 4,5krát vyššímu příjmu K^+ jak za nízkých, tak za vysokých koncentrací K^+ . Podle vědců souvisí odstranění NH_4^+ z média s obnovou hyperpolarizace membrán kořenových buněk, ke které přirozeně dochází při nedostatku K^+ . Při hyperpolarizaci dochází ke změně membránového potenciálu a tím pravděpodobně ke stimulaci vyššího příjmu a nižšího výdeje K^+ (Coskun et al., 2013b). Ve studii Rubio et al., 2014 došli vědci k závěru, že hyperpolarizace membrány může být mechanismem, skrze který dochází k zatím neznámé signální kaskádě, která spouští expresi *HAK* genů. A opravdu by to mohlo dávat smysl – přítomnost NH_4^+ v médiu by mohla potlačit hyperpolarizaci membrány, která nastává při nedostatku K^+ , čímž by se nemohla aktivovat signální kaskáda, která navyšuje expresi *HAK* genů. A poté, co je NH_4^+ odstraněno z média, by mohlo dojít k obnově hyperpolarizace a následně k indukci exprese *HAK* genů.

4.3 Role kinázy CIPK23 v optimalizaci příjmu N a K

Aktivace a inaktivace určitých transportních proteinů většinou souvisí s procesem fosforylace (Lanquar et al., 2009; Xu et al., 2006). Při nedostatku K^+ , který může být spjat s vyšší koncentrací NH_4^+ , dochází k aktivaci kanálu AtAKT1, a to pomocí kinázy CIPK23 (Calcineurin B – like Interacting Protein Kinase 23) (Xu et al., 2006). V této Ca^{2+} signální kaskádě dochází k aktivaci CIPK23 pomocí Ca^{2+} vazebných proteinů CBL1 (calcineurin B – like 1) nebo CBL9 (calcineurin B – like 9). Aktivovaná CIPK23 fosforyluje kanál AtAKT1, čímž dojde k jeho aktivaci a následně dochází k transportu K^+ do buňky (Lan et al., 2011). Ve vztahu ke K^+ bylo dokonce zjištěno, že i regulace transportéru HAK5 je umožněna díky fosforylaci, čímž se zvyšuje jeho aktivita v příjmu K^+ . A tato fosforylace je zprostředkována opět pomocí CIPK23 (Ragel et al., 2015).

Zároveň dochází pomocí CIPK23 i k regulaci transportéru pro NO_3^- , NRT1;1. Tento vysokoafinitní transportér je podobně jako kanál AKT1 schopen fungovat dvojím způsobem, tudíž může přijímat NO_3^- jak při nízkých, tak při vysokých koncentracích v půdě (Liu et al., 1999). Přepínání mezi oběma způsoby fungování zajišťuje právě fosforylace a defosforylace tohoto transportéru. Pokud se NO_3^- vyskytuje v půdě v nízkých koncentracích, pomocí Ca^{2+} signální kaskády dojde k aktivaci CIPK23, která fosforyluje transportér NRT1;1, a ten je schopný fungovat v nízkých koncentracích NO_3^- (Ho et al., 2009). Aktivaci CIPK23 v tomto případě zajišťuje pouze vazebný protein CBL9. Pokud transportér není fosforylovaný, funguje jako nízkoafinitní transportér při vyšších koncentracích NO_3^- (Ho et al., 2009). Regulace příjmu K^+ a NO_3^- je tedy propojena stejnou kinázou, což může naznačovat blízký vztah v udržování rovnováhy mezi dusíkem a draslíkem v buňce.

V souvislosti s AMT, které zajišťují vysokoafinitní transport NH_4^+ , se už delší dobu ví, že jejich fosforylací dojde k inaktivaci transportu (Loqué et al., 2007). Ovšem nevědělo se, která kináza je zodpovědná za zmíněnou fosforylací. S ohledem na interferenci K^+ s NH_4^+ bylo před 2 lety testováno, zda CIPK23, která aktivuje AtAKT1 a AtNRT1;1, nemůže být právě tou kinázou, která fosforyluje vysokoafinitní transportéry AtAMT1 pro NH_4^+ . Touto fosforylací by u zmíněných transportérů došlo k inhibici příjmu NH_4^+ (Lanquar et al., 2009). Výsledky studie z roku 2017 ukázaly několik zajímavých skutečností. Exprese genu *CIPK23* se po aplikaci NH_4^+ zvýšila. Dále, exprese genu *CBL9* se po aplikaci NH_4^+ nezměnila, kdežto exprese *CBL1* se po aplikaci NH_4^+ až pětkrát zvýšila. Navíc, v mutantovi *cipk23* bylo po aplikaci NH_4^+ pozorováno snížení fosforylace AMT1. Konkrétními transportéry, které by mohly přímo interagovat s CIPK23, jsou podle vědců AtAMT1;1 a AtAMT1;2. Podle těchto výsledků je tedy velmi pravděpodobné, že CIPK23 funguje nejen v případě aktivace příjmu K^+ a NO_3^- , ale zároveň i

při inhibici vysokoafinitních transportérů pro NH_4^+ . Aktivita CIPK23 je v případě NH_4^+ závislá jen na vazebném proteinu CBL1 (Straub et al., 2017). CIPK23 je tedy velmi důležitým regulačním proteinem, která se podílí na udržení rovnováhy mezi příjmem N a K.

4.4 Možný efekt interference na utváření kořenového systému

V předchozích kapitolách jsem uvedla, že vyšší koncentrace NH_4^+ může negativně působit na vývoj kořenového systému. Inhibice růstu kořenů je navíc obecným projevem syndromu toxicity amonného iontu. Spolu s působením vyšších koncentrací NH_4^+ se pojí nedostatečný příjem a deficiencie K^+ . Nabízí se tedy otázka, zda jsou vlastně změny růstu kořenového systému opravdu způsobeny jen samotným NH_4^+ nebo právě i nedostatkem K^+ ? Tuto myšlenku by mohly podpořit některé studie, ve kterých je jasně dokázáno, že negativní působení NH_4^+ může být zmírněno přidáním K^+ (Balkos et al., 2009; Szczerba et al., 2008b). Ve studii z roku 1993 byl na rostlinách *Arabidopsis* zkoumán vývoj kořenů za podmínek různé dostupnosti NH_4^+ a K^+ . V přítomnosti 6 mM NH_4^+ a zároveň nedostatku K^+ v médiu měly rostliny značně inhibován vývoj kořenů. Po přidání i nízké koncentrace K^+ (20-100 μM) do média došlo i v přítomnosti NH_4^+ ke zmírnění inhibice a kořeny se vyvíjely o něco lépe. Pokud nebyl NH_4^+ v médiu přítomný vůbec, kořeny rostlin se vyvíjely normálně. Tímto se jen potvrzuje negativní efekt vyšší koncentrace NH_4^+ na kořenový systém ve spojení s nedostatkem K^+ a zmírnění inhibice po přidání K^+ (Cao et al., 1993).

Ve studii z roku 2017 sledovali Li a spoluautoři efekt nízké koncentrace K^+ na vývoj kořenů. Pěstovali rostliny *Arabidopsis* na MS (Murashige and Skoog) médiu, které obsahovalo všechny potřebné živiny, a poté na tzv. LK médiu (low K^+ medium), které obsahovalo jen 0,1 mM K^+ . Důležitým faktem je podle mého názoru to, že LK médium bylo vyrobeno z MS média odebráním KH_2PO_4 (zdroj K^+), který byl nahrazen 1,25 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. NH_4^+ už je přitom v MS médiu obsaženo v podobě NH_4NO_3 . Bylo zjištěno, že s nízkou koncentrací K^+ se snižovala délka kořene. Navíc pozorovali, že nízká koncentrace K^+ způsobí během 24 hod degradaci PIN2 a PIN3 proteinů, které jsou důležité při transportu auxinu. Tím došlo k blokaci transportu auxinu směrem k vrcholu kořene, což způsobilo hromadění auxinu v maturační zóně kořene. Co se týče PIN proteinů, v kapitole Reakce kořenového systému na NH_4^+ jsem zmínila, že NH_4^+ snižuje expresi genu *PIN2*, čímž mění distribuci auxinu v kořeni. Tudiž je možné, že vyvolané změny nemá na svědomí pouze nízká koncentrace K^+ , ale spojení nízké koncentrace K^+ s přítomným NH_4^+ (Li et al., 2017).

5. Závěr

NH_4^+ je významným zdrojem dusíku pro rostliny. Ovšem vzhledem k působení jeho vyšších koncentrací na fyziologii rostlin a vývoj kořenového systému může pro rostlinu představovat zdroj dusíku s komplexnějším působením. Negativní působení vyšších dávek NH_4^+ zřejmě souvisí s dalšími změnami, které byly při aplikaci NH_4^+ pozorovány. Patří sem vyčerpání zdrojů energie v podobě sacharidů a karboxylových kyselin v kořenech nebo změny v pH. Došla jsem k závěru, že reakci rostlin na NH_4^+ není možné určit zcela jednoznačně, neboť je to komplexní záležitost, která závisí na mnoha dalších faktorech. Myslím si, že v tomto ohledu se nedá říci, že koncentrace 1 mM NH_4^+ je nízká nebo vysoká, protože to záleží na konkrétním druhu rostliny a na tom, jaké má možnosti ho zpracovat. Stejně tak záleží na dostupnosti dalších minerálních živin, především na NO_3^- a K^+ . Ovlivnit toxicitu NH_4^+ může také nedostatek světla. I přes veškeré negativní dopady vyšších koncentrací NH_4^+ je tento iont nepostradatelný jako zdroj dusíku a za nízké dostupnosti dusíku ovlivňuje architekturu kořenového systému. Za těchto podmínek je totiž schopen stimulovat tvorbu postranních kořenů v NH_4^+ bohaté oblasti substrátu, což je z hlediska efektivity příjmu dusíku velmi důležité. Neblahým faktem ale zůstává, že v podmínkách vyšších koncentrací NH_4^+ dochází ke snižování příjmu K^+ , který je pro rostliny také životně důležitý. Vzhledem k pozitivnímu i negativnímu efektu NH_4^+ na vývoj kořenového systému a k prokázané interferenci s K^+ je velmi pravděpodobné, že právě tento vztah může způsobovat změny v růstu kořenového systému. Proto si myslím, že by si v budoucnu vztah mezi NH_4^+ a K^+ a změny vyvolané touto interakcí na úrovni kořenového systému zasloužily větší pozornost. V řadě experimentů jsou rostliny pěstovány na médiích s vyšším obsahem NH_4^+ a při interpretaci výsledků je této skutečnosti věnována minimální pozornost. Takovou studií je např. výše zmíněná práce Li et al., 2017.

6. Seznam použitých zdrojů

- Aleman, F., Nieves-Cordones, M., Martinez, V., and Rubio, F. (2011). Root K⁺ Acquisition in Plants: The Arabidopsis thaliana Model. *Plant and Cell Physiology* 52, 1603–1612.
- Ariz, I., Artola, E., Asensio, A.C., Cruchaga, S., Aparicio-Tejo, P.M., and Moran, J.F. (2011). High irradiance increases NH₄⁺ tolerance in *Pisum sativum*: Higher carbon and energy availability improve ion balance but not N assimilation. *Journal of Plant Physiology* 168, 1009–1015.
- Ariz, I., Asensio, A.C., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M., Aparicio-Tejo, P.M., and Moran, J.F. (2013). Changes in the C/N balance caused by increasing external ammonium concentrations are driven by carbon and energy availabilities during ammonium nutrition in pea plants: the key roles of asparagine synthetase and anaplerotic enzymes. *Physiologia Plantarum* 148, 522–537.
- Bai, L., Ma, X., Zhang, G., Song, S., Zhou, Y., Gao, L., Miao, Y., and Song, C.-P. (2014). A Receptor-Like Kinase Mediates Ammonium Homeostasis and Is Important for the Polar Growth of Root Hairs in Arabidopsis. *The Plant Cell* 26, 1497–1511.
- Balkos, K.D., Britto, D.T., and Kronzucker, H.J. (2009). Optimization of ammonium acquisition and metabolism by potassium in rice (*Oryza sativa* L. cv. IR-72). *Plant, Cell & Environment* 33, 23–34.
- Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., and Komives, T. (2015). Overcoming ammonium toxicity. *Plant Science* 231, 184–190.
- Brady, N.C., and Weil, R.R. (1996). The nature and properties of soils. (Prentice-Hall Inc.).
- Britto, D.T., and Kronzucker, H.J. (2002). NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159, 567–584.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., and Kronzucker, H.J. (2001). Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4255–4258.
- Cao, Y., Glass, A.D.M., and Crawford, M. (1993). Ammonium Inhibition of Arabidopsis Root Growth Can Be Reversed by Potassium and by Auxin Resistance Mutations *aux7*, *axr7*, and *axr2'*. *Plant Physiology* 102, 983–989.
- Chaillou, S., Vessey, J.K., Morot-Gaudry, J.F., Raper Jr, C.D., Henry, L.T., and Boutin, J.P. (1991). Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *Journal of Experimental Botany* 42, 189–196.
- Claussen, W., and Lenz, F. (1999). Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and Soil* 208, 95–102.
- Coskun, D., Britto, D.T., and Kronzucker, H.J. (2010). Regulation and mechanism of potassium release from barley roots: an in planta 42K⁺ analysis. *New Phytologist* 188, 1028–1038.

Coskun, D., Britto, D.T., Li, M., Becker, A., and Kronzucker, H.J. (2013a). Rapid Ammonia Gas Transport Accounts for Futile Transmembrane Cycling under NH₃/NH₄⁺ Toxicity in Plant Roots. *Plant Physiology* *163*, 1859–1867.

Coskun, D., Britto, D.T., Li, M., Oh, S., and Kronzucker, H.J. (2013b). Capacity and Plasticity of Potassium Channels and High-Affinity Transporters in Roots of Barley and Arabidopsis. *Plant Physiology* *162*, 496–511.

Coskun, D., Britto, D.T., and Kronzucker, H.J. (2017). The nitrogen-potassium intersection: membranes, metabolism, and mechanism: The N-K intersection. *Plant, Cell & Environment* *40*, 2029–2041.

Cruz, C., Bio, A.F.M., Domínguez-Valdivia, M.D., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., and Martins-Loução, M.A. (2006). How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta* *223*, 1068–1080.

Dougall, D.K. (1974). Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cells cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *58*, 639–646.

Drew (1975). Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot in barley. *New Phytologist* *75*, 479–490.

Epstein, E., Rains, D.W., and Elzam, O.E. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *49*, 684.

Esteban, R., Ariz, I., Cruz, C., and Moran, J.F. (2016). Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Science* *248*, 92–101.

Fu, H.-H., and Luan, S. (1998). AtKUP1: A Dual-Affinity K⁺ Transporter from Arabidopsis. *The Plant Cell* *10*, 63–73.

Garnica, M., Houdusse, F., Yvin, J.C., and Garcia-Mina, J.M. (2009). Nitrate modifies urea root uptake and assimilation in wheat seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *89*, 55–62.

Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., and Frommer, W.B. (1999). Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. *The Plant Cell* *11*, 937–947.

Gerendás, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R.G., and Sattelmacher, B. (1997). Physiological and Biochemical Processes Related to Ammonium Toxicity in Higher Plants. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde* *160*, 239–251.

Giehl, R.F.H., Laginha, A.M., Duan, F., Rentsch, D., Yuan, L., and von Wirén, N. (2017). A Critical Role of AMT2;1 in Root-To-Shoot Translocation of Ammonium in Arabidopsis. *Molecular Plant* *10*, 1449–1460.

Goel, P., and Singh, A.K. (2015). Abiotic Stresses Downregulate Key Genes Involved in Nitrogen Uptake and Assimilation in Brassica juncea L. *PLOS ONE* *10*, e0143645.

- de Graaf, M.C., Bobbink, R., Roelofs, J.G., and Verbeek, P.J. (1998). Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. *Plant Ecology* 135, 185–196.
- Guan, M., de Bang, T.C., Pedersen, C., and Schjoerring, J.K. (2016). Cytosolic Glutamine Synthetase Gln1;2 Is the Main Isozyme Contributing to GS1 Activity and Can Be Up-Regulated to Relieve Ammonium Toxicity. *Plant Physiology* 171, 1921–1933.
- Hachiya, T., Watanabe, C.K., Fujimoto, M., Ishikawa, T., Takahara, K., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Uesono, Y., Terashima, I., and Noguchi, K. (2012). Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. *Plant and Cell Physiology* 53, 577–591.
- Hirel, B., and Gadai, P. (1980). Glutamine Synthetase in Rice: A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiology* 66, 619–623.
- Hirsch, R.E. (1998). A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. *Science* 280, 918–921.
- Ho, C.-H., Lin, S.-H., Hu, H.-C., and Tsay, Y.-F. (2009). CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* 138, 1184–1194.
- Hoopen, F. t., Cuin, T.A., Pedas, P., Hegelund, J.N., Shabala, S., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2010). Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and *Arabidopsis* roots: molecular mechanisms and physiological consequences. *Journal of Experimental Botany* 61, 2303–2315.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H., and Hedrich, R. (2001). K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Letters* 508, 463–469.
- Khademi, S., O’connell, J., Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L.J., and Stroud, R.M. (2004). Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305, 1587–1594.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., and Glass, A.D.M. (1996). Kinetics of NH₄⁺ Influx in Spruce. *Plant Physiology* 110, 773–779.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., and Glass, A.D.M. (1997). Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385, 59–61.
- Kronzucker, H.J., Szczerba, M.W., and Britto, D.T. (2003). Cytosolic potassium homeostasis revisited: 42 K-tracer analysis in *Hordeum vulgare* L. reveals set-point variations in [K⁺]. *Planta* 217, 540–546.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., et al. (2010). Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* 18, 927–937.
- Lam, H.-M. (2003). Overexpression of the ASN1 Gene Enhances Nitrogen Status in Seeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132, 926–935.

- Lam, H.-M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G.M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 569–593.
- Lan, W.-Z., Lee, S.-C., Che, Y.-F., Jiang, Y.-Q., and Luan, S. (2011). Mechanistic Analysis of AKT1 Regulation by the CBL–CIPK–PP2CA Interactions. *Molecular Plant* 4, 527–536.
- Lanquar, V., Loque, D., Hormann, F., Yuan, L., Bohner, A., Engelsberger, W.R., Lalonde, S., Schulze, W.X., von Wiren, N., and Frommer, W.B. (2009). Feedback Inhibition of Ammonium Uptake by a Phospho-Dependent Allosteric Mechanism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 3610–3622.
- Lea, P.J., and Mifflin, B.J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251, 614–616.
- Lew, R.R. (1991). Electrogenic Transport Properties of Growing *Arabidopsis* Root Hairs : The Plasma Membrane Proton Pump and Potassium Channels. *Plant Physiology* 97, 1527–1534.
- Li, J., Wu, W.-H., and Wang, Y. (2017). Potassium channel AKT1 is involved in the auxin-mediated root growth inhibition in *Arabidopsis* response to low K⁺ stress: AKT1 regulates primary root growth under low K⁺ stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 59, 895–909.
- Li, Q., Li, B.-H., Kronzucker, H.J., and Shi, W.-M. (2010). Root growth inhibition by NH₄⁺ in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to NH₄⁺ efflux and GMPase activity: Root growth inhibition by ammonium. *Plant, Cell & Environment* 33, 1529–1542.
- Lima, J.E., Kojima, S., Takahashi, H., and von Wiren, N. (2010a). Ammonium Triggers Lateral Root Branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-Dependent Manner. *The Plant Cell Online* 22, 3621–3633.
- Liu, Y., and von Wirén, N. (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 68, 2581–2592.
- Liu, K.-H., Huang, C.-Y., and Tsay, Y.-F. (1999). CHL1 Is a Dual-Affinity Nitrate Transporter of *Arabidopsis* Involved in Multiple Phases of Nitrate Uptake. *The Plant Cell* 11, 865–874.
- Liu, Y., Lai, N., Gao, K., Chen, F., Yuan, L., and Mi, G. (2013). Ammonium Inhibits Primary Root Growth by Reducing the Length of Meristem and Elongation Zone and Decreasing Elemental Expansion Rate in the Root Apex in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8, e61031.
- Loqué, D., Yuan, L., Kojima, S., Gojon, A., Wirth, J., Gazzarrini, S., Ishiyama, K., Takahashi, H., and von Wirén, N. (2006). Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 48, 522–534.
- Ludewig, U., Neuhäuser, B., and Dynowski, M. (2007). Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* 581, 2301–2308.
- Maathuis, F.J., and Sanders, D. (1995). Contrasting roles in ion transport of two K⁺-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 197, 456–464.

- Magalhaes, J.R., Huber, D.M., and Tsai, C.Y. (1992). Evidence of increased ^{15}N -ammonium assimilation in tomato plants with exogenous α -ketoglutarate. *Plant Science* 85, 135–141.
- Marschner, H. (2011). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (Academic Press).
- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M., and Shaff, J.E. (1990). Evidence for Cotransport of Nitrate and Protons in Maize Roots. *Plant Physiology* 93, 290–294.
- Mehrer, I., and Mohr, H. (1989). Ammonium toxicity: description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiologia Plantarum* 77, 545–554.
- Mifflin, B.J., and Lea, P.J. (1976). The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15, 873–885.
- Mifflin, B.J., and Lea, P.J. (1980). Ammonia assimilation. In *Amino Acids and Derivatives*, (Elsevier), pp. 169–202.
- Miyashita, Y., and Good, A.G. (2008). NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *Journal of Experimental Botany* 59, 667–680.
- Ortiz-Ramirez, C., Mora, S.I., Trejo, J., and Pantoja, O. (2011). AMT1;1, a Highly Selective Ammonium Transporter That Functions as H^+/NH_4^+ Symporter. *Journal of Biological Chemistry* 286, 31113–31122.
- Poole, R.J. (1969). Carrier-mediated Potassium Efflux Across the Cell Membrane of Red Beet. *Plant Physiology* 44, 485–490.
- Potel, F., Valadier, M.-H., Ferrario-Méry, S., Grandjean, O., Morin, H., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Lothier, J., Rothstein, S.J., Hirose, N., et al. (2009). Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana* - roles of glutamate synthases and carbamoylphosphate synthetase in leaves. *FEBS Journal* 276, 4061–4076.
- Qi, Z., Hampton, C.R., Shin, R., Barkla, B.J., White, P.J., and Schachtman, D.P. (2008). The high affinity K^+ transporter AtHAK5 plays a physiological role *in planta* at very low K^+ concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 59, 595–607.
- Qin, C., Qian, W., Wang, W., Wu, Y., Yu, C., Jiang, X., Wang, D., and Wu, P. (2008). GDP-mannose pyrophosphorylase is a genetic determinant of ammonium sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 18308–18313.
- Ragel, P., Ródenas, R., García-Martín, E., Andrés, Z., Villalta, I., Nieves-Cordones, M., Rivero, R.M., Martínez, V., Pardo, J.M., Quintero, F.J., et al. (2015). CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K^+ uptake in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* 169, 2863–2873.
- Rawat, S.R., Silim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., and Glass, A.D.M. (1999). AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal* 19, 143–152.

- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B.G., and Gojon, A. (2006). The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 19206–19211.
- Roosta, H.R., and Schjoerring, J.K. (2007). Effects of Ammonium Toxicity on Nitrogen Metabolism and Elemental Profile of Cucumber Plants. *Journal of Plant Nutrition* *30*, 1933–1951.
- Roosta, H.R., and Schjoerring, J.K. (2008). Root Carbon Enrichment Alleviates Ammonium Toxicity in Cucumber Plants. *Journal of Plant Nutrition* *31*, 941–958.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., and Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum* *134*, 598–608.
- Rubio, F., Fon, M., Ródenas, R., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Rivero, R.M., and Martínez, V. (2014). A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiologia Plantarum* *152*, 558–570.
- Santa-María, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., and Rodríguez-Navarro, A. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell* *9*, 2281–2289.
- Saparov, S.M., Liu, K., Agre, P., and Pohl, P. (2007). Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 5296–5301.
- Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A., and Gaber, R.F. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* *258*, 1654–1658.
- Schubert, S., and Yan, F. (1997). Nitrate and ammonium nutrition of plants: effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H⁺ ATPase. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde* *160*, 275–281.
- Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I.D., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis, A., Papadakis, A.K., Stephanou, E.G., and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2006). Abiotic Stress Generates ROS That Signal Expression of Anionic Glutamate Dehydrogenases to Form Glutamate for Proline Synthesis in Tobacco and Grapevine. *The Plant Cell Online* *18*, 2767–2781.
- Sohlenkamp, C. (2002). Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a High-Affinity Ammonium Transporter of the Plasma Membrane. *Plant Physiology* *130*, 1788–1796.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., Yamaya, T., and Yamaguchi, J. (2003). Feedback Regulation of the Ammonium Transporter Gene Family AMT1 by Glutamine in Rice. *Plant and Cell Physiology* *44*, 1396–1402.
- Straub, T., Ludewig, U., and Neuhäuser, B. (2017). The Kinase CIPK23 Inhibits Ammonium Transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* *29*, 409–422.

- Swarup, R., Kramer, E.M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H.O., Haseloff, J., Beemster, G.T., Bhalerao, R., and Bennett, M.J. (2005). Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology* 7, 1057.
- Szczerba, M.W., Britto, D.T., and Kronzucker, H.J. (2006). Rapid, Futile K⁺ Cycling and Pool-Size Dynamics Define Low-Affinity Potassium Transport in Barley. *Plant Physiology* 141, 1494–1507.
- Szczerba, M.W., Britto, D.T., Ali, S.A., Balkos, K.D., and Kronzucker, H.J. (2008a). NH₄⁺-stimulated and -inhibited components of K⁺ transport in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 59, 3415–3423.
- Szczerba, M.W., Britto, D.T., Balkos, K.D., and Kronzucker, H.J. (2008b). Alleviation of rapid, futile ammonium cycling at the plasma membrane by potassium reveals K⁺-sensitive and -insensitive components of NH₄⁺ transport. *Journal of Experimental Botany* 59, 303–313.
- Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment* 23, 1005–1024.
- Uenishi, Y., Nakabayashi, Y., Tsuchihira, A., Takusagawa, M., Hashimoto, K., Maeshima, M., and Sato-Nara, K. (2014). Accumulation of TIP2;2 Aquaporin during Dark Adaptation Is Partially PhyA Dependent in Roots of Arabidopsis Seedlings. *Plants* 3, 177–195.
- Van Dijk, H.F.G., Creemers, R.C.M., Rijniers, J., and Roelofs, J.G.M. (1989). Impact of artificial ammonium-enriched rainwater on soils and young coniferous trees in a greenhouse. Part I—Effects on the soils. *Environmental Pollution* 62, 317–336.
- Van Dijk, H.F.G., De Louw, M.H.J., Roelofs, J.G.M., and Verburgh, J.J. (1990). Impact of artificial, ammonium-enriched rainwater on soils and young coniferous trees in a greenhouse. Part II—effects on the trees. *Environmental Pollution* 63, 41–59.
- Vatter, T., Neuhäuser, B., Stetter, M., and Ludewig, U. (2015). Regulation of length and density of Arabidopsis root hairs by ammonium and nitrate. *Journal of Plant Research* 128, 839–848.
- Wallsgrave, R.M., Lea, P.J., and Miflin, B.J. (1979). Distribution of the Enzymes of Nitrogen Assimilation within the Pea Leaf Cell. *Plant Physiology* 63, 232–236.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., and Glass, A.D.M. (1993a). Ammonium Uptake by Rice Roots, II. Kinetics of ¹³NH₄⁺ Influx across the Plasmalemma. *Plant Physiology* 103, 1259–1267.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., and Glass, A.D. (1993b). Ammonium uptake by rice roots (I. Fluxes and subcellular distribution of ¹³NH₄⁺). *Plant Physiology* 103, 1249–1258.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., and Glass, A.D.M. (1996). Interactions between K⁺ and NH₄⁺: effects on ion uptake by rice roots. *Plant, Cell & Environment* 19, 1037–1046.

- Wirén, N. von, and Merrick, M. (2004). Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. In *Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 95–120.
- Xu, J., Li, H.-D., Chen, L.-Q., Wang, Y., Liu, L.-L., He, L., and Wu, W.-H. (2006). A Protein Kinase, Interacting with Two Calcineurin B-like Proteins, Regulates K⁺ Transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* *125*, 1347–1360.
- Yang, N., Zhu, C., Gan, L., Ng, D., and Xia, K. (2011). Ammonium-Stimulated Root Hair Branching is Enhanced by Methyl Jasmonate and Suppressed by Ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology* *54*, 92–100.
- Yuan, L., Loque, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H., and von Wirén, N. (2007). The Organization of High-Affinity Ammonium Uptake in *Arabidopsis* Roots Depends on the Spatial Arrangement and Biochemical Properties of AMT1-Type Transporters. *The Plant Cell Online* *19*, 2636–2652.
- Yuan, L., Graff, L., Loqué, D., Kojima, S., Tsuchiya, Y.N., Takahashi, H., and von Wirén, N. (2009). AtAMT1;4, a Pollen-Specific High-Affinity Ammonium Transporter of the Plasma Membrane in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* *50*, 13–25.
- Zhang, F., Niu, J., Zhang, W., Chen, X., Li, C., Yuan, L., and Xie, J. (2010). Potassium nutrition of crops under varied regimes of nitrogen supply. *Plant and Soil* *335*, 21–34.
- Zheng, X., He, K., Kleist, T., Chen, F., and Luan, S. (2015). Anion channel SLAH 3 functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* *38*, 474–486.
- Zhou, Y., Bai, L., and Song, C.-P. (2015). Ammonium homeostasis and signaling in plant cells. *Science Bulletin* *60*, 741–747.
- Zhu, C., Yang, N., Guo, Z., Qian, M., and Gan, L. (2016). An ethylene and ROS-dependent pathway is involved in low ammonium-induced root hair elongation in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* *105*, 37–44.
- Zhu, Y., Di, T., Xu, G., Chen, X., Zeng, H., Yan, F., and Shen, Q. (2009). Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant, Cell & Environment* *32*, 1428–1440.