

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Hana Štočková

Funkce transportéru AtKUP5 v *Arabidopsis thaliana*

Function of the AtKUP5 transporter in *Arabidopsis thaliana*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marek Šustr

Praha, 2020

Prohlášení

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

V Praze

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za trpělivé vedení mé práce, za její ochotu, motivaci a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Mgr. Markovi Šustrovi, který mi byl nápomocen od počátku mé práce. Dále chci poděkovat Ing. Yvettě Šefrnové za její pomoc a získané zkušenosti při práci v laboratoři. Velké díky patří také všem členům naší laboratoře za podněty, rady a předané zkušenosti.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Cíle práce.....	2
2	Přehled literatury	3
2.1	Draslík	3
2.2	Deficience draslíku u rostlin.....	3
2.3	Příjem a transport K^+ v rostlině.....	6
2.3.1	Rodiny rostlinných draselných kanálů	7
2.3.2	Rodiny rostlinných draselných přenašečů.....	8
2.4	KUP5	11
2.5	Transportéry KT/HAK/KUP v jiných rostlinných druzích	14
3	Metodika.....	17
3.1	Rostlinný materiál, kultivační podmínky a genotypování.....	17
	T-DNA linie <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
	Ověření přítomnosti T-DNA inserce genotypováním.....	17
	Izolace genomové DNA z listů <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	19
	Agarózová elektroforéza	19
3.2	Růstová analýza T-DNA inserčních mutantů	20
	Kultivace rostlin <i>in vitro</i> na agarových miskách.....	20
	Kultivační média	21
	Fenotypová analýza kořenového systému a její vyhodnocení	22
	Statistické vyhodnocení.....	22
3.3	Příprava rostlin nesoucích translační a transkripční fúze.....	22
	Bakterie	22
3.3.1	Metoda transformace a design konstruktů	23
	Multisite gateway system	23

Design translační fúze KUP5 pro Multisite Gateway®.....	24
Design transkripční fúze KUP5 pro Multisite Gateway®	25
Vektory	26
3.3.2 Postup přípravy konstruktů a transformace rostlin.....	29
Izolace genomové DNA.....	29
Amplifikace	29
BP reakce	30
Elektroporace	30
Colony PCR (kontrolní PCR kolonií).....	31
LR reakce	32
Elektroporace	33
Vnesení vektoru do rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> metodou floral dip	34
Selekce transformovaných rostlin.....	34
3.3.3 Analýza transformovaných rostlin.....	35
Mikroskopie	35
Růstová analýza <i>35S::KUP5::GFP</i> rostlin	35
Detekce aktivity GUS	35
4 Výsledky.....	37
4.1 Ověření T-DNA inzerčních mutantů	37
4.2 Fenotypová analýza T-DNA inzerčních mutantů	37
4.2.1 Experiment 1	38
4.2.2 Experiment 2	47
4.3 Lokalizace KUP5:GFP na buněčné úrovni	54
4.3.1 Lokalizace KUP5:GFP v rostlinách <i>Arabidopsis Col-0</i> nesoucích konstrukt <i>pKUP5::KUP5:GFP</i>	54
4.3.2 Lokalizace KUP5:GFP v <i>rdm6</i> rostlinách <i>Arabidopsis</i> nesoucích konstrukt <i>35S::KUP5:GFP</i>	59
4.4 Lokalizace exprese <i>KUP5</i> v rámci rostliny pomocí transkripční fúze <i>pKUP5::GUS67</i>	

5	Diskuze	68
5.1	Hodnocení růstu homozygotních mutantů <i>kup5</i> oproti rostlinám divokého typu	68
5.1.1	Reakce na nedostatek K^+ v prostředí	72
5.1.2	Reakce na salinitu a sucho	73
5.2	Lokalizace transportéru KUP5	74
6	Závěr	76
7	Seznam použité literatury	77

Abstrakt

Draslík je jedním z esenciálních prvků nezbytných pro růst rostlin. Podílí se na mnoha rostlinných procesech, jako jsou osmoregulace, aktivace enzymů ad. Tyto funkce jsou úzce spjaty s jeho transportem v buňce i celé rostlině. Ačkoliv se draslík hojně vyskytuje v zemské kůře, množství formy přímo dostupné pro rostliny nebývá dostačující. Nedostatek draslíku se projevuje na mnoha úrovních a podílí se i na snížení výnosu a kvality zemědělských plodin.

V rostlině existuje velké množství proteinů transportujících draslík. Jednou z důležitých rodin draselných transportérů je rodina KT/HAK/KUP. Do této rodiny patří mimo jiné i vysokoafinitní transportér HAK5, který je klíčový pro příjem draslíku z prostředí při jeho nízké dostupnosti.

Jedním z nepříliš prozkoumaných transportérů z rodiny KT/HAK/KUP je i transportér KUP5, kterému se ve své diplomové práci věnuji. Cílem této práce je analyzovat fenotypové projevy T-DNA inzerčních mutantů *kup5* a charakterizovat funkce transportéru KUP5 v rostlinách *Arabidopsis thaliana*. V experimentech jsem analyzovala růst inzerčních mutantů *kup5* v různých podmínkách prostředí a provedla jsem transformaci rostlin za účelem zjistit lokalizaci transportéru KUP5 v buňce a lokalizovat expresi genu *KUP5* v rostlině.

Dle mých pozorování *kup5* mutantní rostliny dosahují větších rozměrů oproti rostlinám divokého typu. Toto pozorování by mohlo naznačovat, že se KUP5 podílí na regulaci draslíkové homeostázi, potažmo regulaci turgoru během růstu buněk. *Kup5* mutantní rostliny se neliší v citlivosti k nedostatku draslíku, zasolení ani suchu a nevykazují defekty v růstu kořenových vlásků. Lokalizace KUP5:GFP byla pozorována v endoplazmatickém retikulu. Lze tedy uzavřít, že transportér KUP5 zřejmě není důležitý pro příjem draslíku z prostředí při jeho nízké dostupnosti a hraje roli spíše v udržování draslíkové homeostáze uvnitř buňky než v transportu draslíku přes plazmatickou membránu. Tyto závěry bude třeba dále ověřit v navazujících experimentech.

Klíčová slova: draslík, vysokoafinitní transport, rodina KT/HAK/KUP, růst rostliny

Abstract

Potassium is one of the essential elements necessary for plant growth. It is involved in many plant processes, such as osmoregulation, enzymes activation, etc. These functions are very often closely related to its transport in the cell and the whole plant. Although potassium is abundant in earth's crust, the amount of plant-available form is often insufficient. Potassium deficiency manifests itself on many levels and also contributes to the reduction of yield and quality of agricultural crops.

There are many potassium-transporting proteins in the plant. One of the important families of potassium transporters is the KT/HAK/KUP family. This family includes, among others, the high-affinity transporter HAK5, which is key for the uptake of potassium from the environment with low-potassium availability. One of the not very characterized transporters from the KT/HAK/KUP family is the KUP5 transporter, which I deal with in my diploma thesis. The aim of this work is to analyze the phenotypic manifestations of *kup5* T-DNA insertion mutants and to characterize the functions of the transporter KUP5 in *Arabidopsis thaliana* plants. I analyzed the growth of *kup5* insertion mutants in various environmental conditions and performed plant transformation to determine the localization of the KUP5 transporter in the cell and to localize the expression of the *KUP5* gene in the plant.

According to my observations, *kup5* mutant plants were larger than wild-type plants. This observation could suggest that KUP5 might be involved in the regulation of potassium homeostasis and thus the regulation of turgor during cell growth. *Kup5* mutant plants do not differ in sensitivity to potassium deficiency, salinity or drought and do not show defects in root hair growth. Localization of KUP5:GFP was observed in the endoplasmic reticulum. Thus, it can be concluded that the KUP5 transporter does not appear to be important for potassium uptake from the environment at low availability. It rather plays a role in maintaining cell potassium homeostasis than in potassium transporting across the plasma membrane. These conclusions will need to be further verified in subsequent experiments.

Key words: potassium, high-affinity transport, KT/HAK/KUP family, plant growth

Seznam použitých zkratek

AC – adenylátcykláza

AKT1 – K⁺ kanál (*Arabidopsis* K⁺ transporter 1)

ATP – adenosintrifosfát

cAMP – cyklický adenosin 3', 5' monofosfát

CBL – vápníkový senzor (calcineurin B-like proteins)

CHX – (cation/H⁺ exchanger)

CIPK – calcineurin B – like protein interagující kináza (CBL-interacting protein kinase)

CNGC – cyclic nucleotid gated channels

CDS – kódující oblast genu (coding sequence)

DMSO – dimethylsulfoxid

ER – endoplazmatické retikulum

GORK – K⁺ kanál (guard cell outward rectifying K⁺)

HAK5 – vysokoafinitní transportér K⁺ (high-affinity K⁺ transporter 5)

HKT – vysokoafinitní transportér K⁺ (high-affinity K⁺ transporter)

IAA – kyselina indol-3-octová

KAT1 a KAT2 – K⁺ kanály (K⁺ channel in *Arabidopsis thaliana* 1, 2)

KEA3 – K⁺/H⁺ antiporter 3

KUP – transportér z rodiny KT/HAK/KUP (K⁺ uptake protein)

KT/HAK/KUP – rodina vysokoafinitních transportérů K⁺ (KT – K⁺ transporter/HAK - high-affinity

K⁺/KUP – K⁺ uptake protein

NASC – The European *Arabidopsis* Stock Centre

NHX – antiporter Na⁺ (Na⁺/H⁺ exchanger)

PCR – Polymerázová řetězová reakce

PM – plazmatická membrána

PP2C – fosfatáza (protein phosphatases 2C)

RCI3 – peroxidáza (rare Cold In- ducible gene 3)

Rdr6 – RNA dependentní RNA polymeráza 6

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

R/S – poměr biomasy kořenů ku biomase nadzemní části (root/shoot ratio)

RT-PCR – realtime polymerase chain reaction

SE – střední chyba průměru (standard error of the mean)

SKOR – K⁺ kanál (stellar K⁺-outward rectifying)

SPIK – K⁺ kanál (shaker pollen inward K⁺ channel)

TPK – K⁺ kanál (tandem pore K⁺)

TRH1/KUP4 – transportér z rodiny KT/HAK/KUP transportující auxin (tiny root hair 1/ K⁺ uptake 4)

WOX11 – WUSCHEL-related Homeobox 11

1 Úvod

Rostliny jsou vzhledem k přisedlému způsobu života nuceny reagovat na půdní podmínky různých stanovišť a zajistit příjem dostatečného množství esenciálních minerálních živin z heterogenního a velmi proměnlivého půdního prostředí. Jednou z esenciálních minerálních živin je i K^+ , který je zapojen v mnoha rostlinných procesech (Marschner 1995). Jako příklady těchto procesů lze uvést osmoregulaci, iontovou homeostázi, aktivaci enzymů apod. S těmito procesy jsou spojeny různé děje, jako je objemový růst buněk, regulace otevřenosti průduchů, fotosyntéza, proteosyntéza ad., jejichž správná funkce je pro rostlinu velmi důležitá (Marschner 1995, Pettigrew 2008).

Pro optimální růst potřebují rostliny dostatečné množství esenciálních prvků. Pokud jej nemají, mohou se vyskytnout změny v jejich metabolických procesech, morfologii, či schopnosti reagovat na podmínky prostředí (Wang and Wu 2013). Tyto změny mohou u zemědělských plodin, v závislosti na intenzitě deficiencie, ovlivnit množství a kvalitu úrody (Wang and Wu 2015). Ačkoliv je draslík jeden z nejhojněji se vyskytujících prvků zemské kůry, rostliny se ve většině půd potýkají s nedostatkem K^+ , což je forma dostupná pro příjem kořeny rostlin (Brady and Weil 2002). Díky tomu je nutné K^+ dodávat ve formě hnojiv pro lepší kvalitu a výnos zemědělské produkce. Přestože celosvětová aplikace K^+ v hnojivech stoupá, jsou oblasti, ve kterých je stále množství K^+ v půdě nedostačující (Zörb et al. 2014).

U rostlin se během evoluce vyvinula řada mechanismů, jak reagovat na nedostatek K^+ a stimulovat jeho příjem z prostředí. Příjem K^+ je zajišťován především pomocí kořenů a mechanismus příjmu se liší v závislosti na vnější koncentraci K^+ . Při koncentraci K^+ v rhizosféře nad 0,3 mM je K^+ přijímán především pomocí nízkoafinitních kanálů (Schroeder et al. 1994). Pokud je koncentrace K^+ nižší, je přijímán pomocí vysokoafinitních přenašečů. Draselné kanály patří především do rodin Shaker a TPK (tandem-pore K^+ channel). Mluvíme-li o draselných transportérech, hrají největší roli rodiny KT/HAK/KUP (K^+ transporter/high-affinity K^+/K^+ uptake protein), HKT (high-affinity K^+ transporter), NHX (Na^+/H^+ exchanger) a CHX (cation/ H^+ exchanger) (Wang and Wu 2013).

Ve své práci se budu věnovat především rodině KT/HAK/KUP, do které patří i mnou zkoumaný transportér KUP5 (K^+ uptake protein 5). Do této rodiny patří např. transportér HAK5 (high-affinity K^+ transporter 5) zapojený do příjmu K^+ při jeho nízké dostupnosti v půdě. Dále KUP7 (K^+ uptake protein 7), jenž napomáhá nakládání K^+ do xylému (Han et al. 2016). KUP2, KUP6, KUP8 (K^+ uptake protein 2, 6, 8) jsou zapojeny při výdeji K^+ z buňky (Osakabe et al. 2013) a TRH1/KUP4 (tiny root hair 1/ K^+ uptake protein 4) hraje roli

v distribuci auxinu (Vicente-Agullo et al. 2004). Rodina KT/HAK/KUP obsahuje i doposud necharakterizované transportéry. Některým z nich se věnoval ve své diplomové práci Marek Šustr (Šustr 2015). Ten v pilotních experimentech s inzerčními mutanty huseníčku, nesoucími T-DNA inzerci v genech kódujících vybrané transportéry rodiny KT/HAK/KUP, pozoroval větší produkci biomasy u *kup5* mutantních rostlin ve srovnání s rostlinami divokého typu. I díky jeho pozorování jsem se zaměřila na charakterizaci právě transportéru KUP5. Jeho role v K^+ transportu zatím nebyla popsána, zajímavé však je zjištění, že má kromě schopnosti transportovat K^+ také adenylátcyklázovou aktivitu (Al-Younis et al. 2018).

1.1 Cíle práce

Tato práce navazuje na mou bakalářskou práci „Deficience draslíku – projevy a odpověď rostliny“ o projevech a odpovědích rostliny na deficienci draslíku a také na diplomovou práci Mgr. Marka Šustra. Jak bylo zmíněno výše, byly zde zaznamenány rozdílné hodnoty v produkci biomasy u *kup5* mutantních rostlin ve srovnání s divokým typem. Tato práce má proto za cíl podrobnější charakterizaci T-DNA inzerčních mutantů *Arabidopsis* v genu *KUP5* a bližší charakterizaci funkce tohoto dosud málo prozkoumaného proteinu v rostlině.

Konkrétní cíle práce:

- Fenotypová analýza *kup5* T-DNA inzerčních mutantů
 - základní růstová analýza
 - citlivost k nedostatku K^+
 - reakce na vybrané stresové faktory (salinita, sucho)
- Lokalizace exprese *KUP5* v rostlině pomocí transkripční fúze *pKUP5::GUS*
- Lokalizace transportéru *KUP5* v buňce pomocí translační fúze *pKUP5::KUP5:GFP* a *35S::KUP5:GFP*

2 Přehled literatury

2.1 Draslík

Draslík můžeme v půdě najít ve formě kladně nabitého monovalentního kationtu a v této podobě je rostlina schopna ho přijmout. Draslík představuje 2,6 % hmotnosti zemské kůry, zatímco koncentrace dalších makroprvků P a N v horninách jsou mnohem nižší (Sardans and Penuelas 2015). Zdroji K^+ jsou především minerály, a draslík se může v půdě vyskytovat ve třech různě dostupných formách. Největší množství draslíku (90-98 %) se v půdě vyskytuje v nedostupné formě, kde je draslík přímo vázaný v primárních minerálech. Pomalu dostupná forma se nachází pevně vázaná v sekundárních minerálech a množství takto se vyskytujícího draslíku činí 1-10 %. Nejmenší množství (0,1 – 0,2 % z celkového množství) se nachází v přímo dostupné formě, ve vodném roztoku nebo ve formě vyměnitelného K^+ sorbovaného na povrchu půdních koloidních částic (Römheld and Kirkby 2010). Ačkoliv je tedy draslík v zemské kůře hojně zastoupen, může být množství K^+ dostupného pro příjem kořeny rostlin jen velmi omezené (Sardans and Penuelas 2015).

Je více možností, jak se draslík může dostávat z primárních minerálů do půdního roztoku. Nejčastěji však přeměna probíhá zvětráváním minerálů obsahujících K^+ , kdy se nedostupný K^+ mění přes pomalu dostupný K^+ až k přímo dostupnému K^+ v půdních roztocích. Existují však i případy, kdy se nevyskytuje pomalu dostupná forma draslíku a K^+ je přímo z primárního minerálu uvolňován do půdního roztoku (Brady and Weil 2002). Pokud v půdě není dostatečné množství dostupného K^+ , které rostlina potřebuje ke správnému fungování fyziologických funkcí, mohou se na rostlinách objevit projevy deficience K^+ .

2.2 Deficience draslíku u rostlin

Jako jeden z esenciálních makroprvků hraje K^+ důležitou roli v růstu a vývoji rostliny (Marschner 1995). Je to nejhojněji se vyskytující kationt v rostlinách a je zapojen do morfologických, fyziologických, biochemických a molekulárních procesů v rostlinách (Hafsi et al. 2014). Při deficienci K^+ dochází ke změnám v těchto procesech a ke zhoršení prospívání rostliny a s tím souvisejícímu zhoršení kvality a kvantity rostlinné produkce (Wang and Wu 2013).

Díky velké mobilitě K^+ v rámci rostliny je K^+ transportován do rostoucích částí a projevy deficience jsou znatelné především na starších částech rostlin (Marschner et al. 1996). Na listech jsou pozorovatelné chlorózy, později až nekrózy (viz obrázek č. 1) (Zörb et al. 2014).



Obrázek č. 1 – Listy lupiny bílé. Horní řada listů je postižena nedostatkem K^+ , jsou zde znatelné chlorózy a nekrózy listů. Spodní řada je kontrolní. Listy jsou seřazeny zleva doprava od nejstarších k mladším. (Zörb et al. 2014)

K^+ je zapojen do mnoha rostlinných procesů, jeho deficiencie se může projevit poklesem enzymatické aktivity a transportu látek v rostlině. Při jeho nedostatku se u rostlin může projevit narušení regulace průduchů, zpomalení fotosyntézy, zhoršení regulace osmotického potenciálu, nebo zvýšená tvorba ROS (Marschner 1995).

K^+ deficientní podmínky mohou způsobit i změny ve velikosti a stavbě rostlinného těla. U některých rostlin např. u bavlníku a fazolu bylo zaznamenáno zmenšení listové plochy (O'Toole et al. 1980, Pettigrew 1999, Zhao et al. 2001). U bavlníku byla také pozorována redukce počtu nodů na postranních větvích, ačkoliv na hlavním stonku tento jev pozorován nebyl (Gerardeaux et al. 2010). Některé práce hovoří i o rozdílné tloušťce listu, např. u fazolu (O'Toole et al. 1980) a kukuřice (Al-Abbas et al. 1972), avšak v jiných experimentech u řepky a bavlníku nebyl tento jev pozorován (Zhao et al. 2001, Lu et al. 2016).

Nedostatek K^+ má ale vliv především na architekturu kořenového systému. U *Arabidopsis thaliana* bylo pozorováno snížení rychlosti růstu postranních kořenů i jejich počtu (Shin and Schachtman 2004). Ohledně délky hlavního kořene se výsledky výzkumů liší, některé práce zaznamenaly zkrácení délky hlavního kořene (Jung et al. 2009, Kim et al. 2010), jiné i přes velmi podobné kultivační podmínky a stejný ekotyp Col-0 tento jev neprokázaly (Shin and Schachtman 2004). Jednotlivé ekotypy *Arabidopsis thaliana* se svojí architekturou kořenů mohou lišit již v kontrolních podmínkách a v deficientních podmínkách jsou rozdíly znásobeny (Kellermeier et al. 2013).

U rostlin kukuřice trpících nedostatkem živin byla pozorována i zvýšená tvorba aerenchymu v kořenech. Tato adaptace umožňuje zachovat růst kořenů s nižšími metabolickými náklady a byla pozorována také při nedostatku P nebo N (Postma and Lynch 2011).

Nedostatek K^+ nemá vliv pouze na kořenový systém, ale bylo zaznamenáno i snížení rychlosti fotosyntézy a asimilace CO_2 (Zhao et al. 2001, Lu et al. 2016). Některé draselné kanály jsou zapojeny do správné funkce průduchů. Při otvírání průduchů kanály KAT1 a KAT2 (K^+ channel in *Arabidopsis thaliana* 1, 2) zajišťují vtok K^+ přes PM (plazmatickou membránu), zatímco při zavírání průduchů výtok K^+ zajišťuje kanál GORK (guard cell outward rectifying K^+) (Hosy et al. 2003).

Zřejmě nejen zhoršená vodivost průduchů může za snížení rychlosti fotosyntézy. U K^+ deficientních rostlin se předpokládá i negativní ovlivnění dějů na tylakoidní membráně, kde je zapojen K^+/H^+ antiporter KEA3 (K^+ efflux antiporter), který zajišťuje výtok K^+ a tím pomáhá vyrovnat tok protonů, aby nedošlo k hyperpolarizaci membrány (Kunz et al. 2014, Höhner et al. 2016)

U rostlin postižených nedostatkem K^+ bylo pozorováno i snížení vodivosti mezofylu (Battie-Laclau et al. 2014, Lu et al. 2016), snížení obsahu chlorofylu v chloroplastech (Zhao et al. 2001, Lu et al. 2016) a změna struktury chloroplastu (Zhao et al. 2001).

Svoji roli mohou sehrát i reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS se v chloroplastu objevují při různých stresových situacích. Při působení ROS může nastat poškození membrán, degradace chlorofylu a následkem toho i vznik listových chloróz (Cakmak 2005).

U rostlin trpících nedostatkem K^+ byla pozorována zvýšená akumulace sacharózy v listech (Huber 1984, Marschner et al. 1996, Zhao et al. 2001, Hermans et al. 2006). I tento jev může souviset se snížením rychlosti fotosyntézy (Araya et al. 2006). Sacharidy jsou akumulované v listech, protože jejich transport floémem do ostatních částí rostliny se snižuje. To souvisí s rolí K^+ při nakládání do floému a jeho samotným transportem (Cooke et al. 1977, Deeken et al. 2002). S akumulací sacharózy v listech může souviset i zvýšená suchá hmotnost listů v porovnání s kořeny (O'Toole et al. 1980, Gerardeaux et al. 2010, Lu et al. 2016). Transport sacharidů z listů do ostatních částí, tedy i do kořenů je snížen a ty jsou nedostatkem K^+ redukovány v růstu více než prýty (Hermans et al. 2006). Pokles transportu asimilátů z listů do kořenů a zvýšení akumulace sacharidů v listech má za následek pokles R/S poměru (root/shoot ratio, poměr hmotnosti kořenů vůči nadzemní části). Pokles R/S poměru byl pozorován u více rostlinných druhů, např. u fazolu obecného (Marschner et al. 1996), ibišku (Egilla et al. 2001), *Arabidopsis thaliana* (Hermans et al. 2006), bavlníku (Gerardeaux et al.

2010). Existují ale i experimenty, ve kterých snížení tohoto poměru nebylo tolik výrazné (Jordan-Meille and Pellerin 2008).

2.3 Příjem a transport K^+ v rostlině

U vyšších rostlin probíhá příjem K^+ především pomocí kořenů a v závislosti na koncentraci K^+ v půdě se zapojují různé transportní systémy. Kořeny přijímají K^+ proti koncentračnímu spádu vzhledem k jeho vyšší koncentraci v cytosolu oproti rhizosféře (Wang and Wu 2013). Koncentrace K^+ v rhizosféře bývá okolo 0,1 až 1 mM (Maathuis 2009), zatímco koncentrace K^+ v cytosolu se většinou pohybuje kolem 100 mM (Schroeder JI, Ward JM 1994). Ve vakuole je rozpětí koncentrací větší, s hodnotami v rozmezí 10 – 200 mM (Walker et al. 1996).

V závislosti na koncentraci v rhizosféře je příjem zprostředkován vysokoafinitními nebo nízkoafinitním transportéry, které se zapojují v různé míře podle aktuální potřeby. Pokud je koncentrace K^+ velmi nízká, tedy pod 0,2 mM, přijímá rostlina K^+ především pomocí vysokoafinitních transportérů (Epstein et al. 1963). Je-li koncentrace nad 0,3 mM, využívá rostlina přednostně nízkoafinitní transportéry (Schroeder JI, Ward JM 1994).

Nízké množství K^+ v rhizosféře vede k aktivaci exprese genů kódujících vysokoafinitní transportéry K^+ a tyto transportéry se ve zvýšené míře vyskytují na PM. Absorpce K^+ závisí nejen na koncentraci K^+ v okolí, ale rostlina zvyšuje absorpci K^+ pomocí protonových pump (H^+ ATPáz), díky čemuž změní elektrochemický potenciál, který může pohánět příjem K^+ pomocí transportérů, které jsou schopny kotransportovat K^+ a H^+ (Rodríguez-Navarro 2000).

V rostlině je mnoho genů kódujících proteiny transportující K^+ . U *Arabidopsis thaliana* existují dva prioritní proteiny, které zajišťují téměř všechny příjem K^+ pomocí kořenů (Gierth et al. 2005). Jedná se o transportér HAK5 (high-affinity K^+ transporter 5) a kanál AKT1 (*Arabidopsis* K^+ transporter 1) (Hirsch et al. 1998, Gierth and Mäser 2007). Transportér HAK5 patří do rodiny KT/HAK/KUP, do které spadá i transportér KUP5 a kanál AKT1 patří do rodiny Shaker (Gierth et al. 2005).

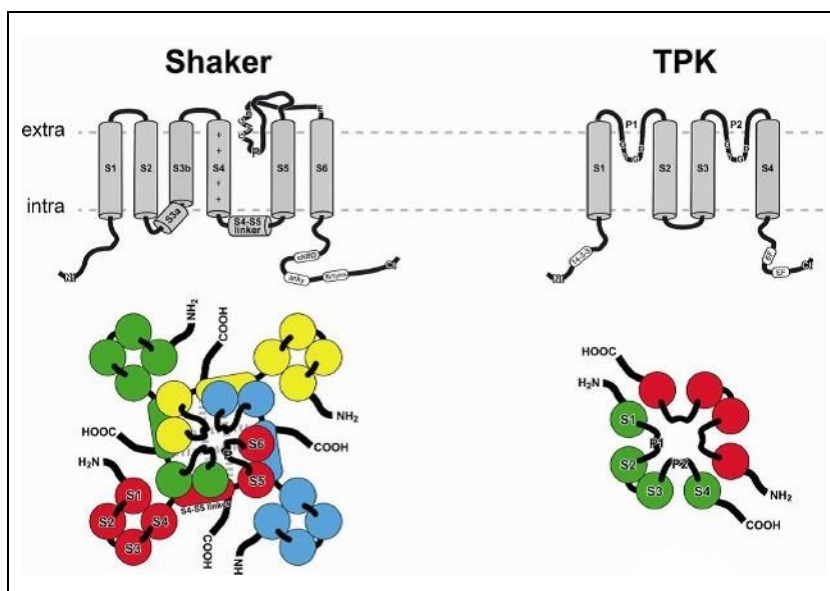
2.3.1 Rodiny rostlinných draselných kanálů

U draselných kanálů rozlišujeme především dvě nejdůležitější rodiny, a to rodinu Shaker a TPK (tandem-pore K⁺ channel). Zmíněný kanál AKT1 patří do rodiny Shaker (Sharma et al. 2013).

Rodina Shaker

Kanály této rodiny jsou tetramery, jejichž každá podjednotka má 6 transmembránových domén (viz obrázek č. 2). Tyto kanály mají senzor napětí, díky kterému jsou schopné reagovat na změnu membránového potenciálu (Sharma et al. 2013).

Kanál AKT1, který je exprimovaný v kořenech, je lokalizován na PM buněk rhizodermis a primární kůry a je hlavním kanálem umožňujícím vstup K⁺ do cytoplasmy (Lagarde et al. 1996). I přestože je AKT1 kanál, vykazuje duální afinitu. Má nejen nízkoafinitní schopnost příjmu K⁺, ale i vysokokoafinitní, která se projeví, pokud dojde k poklesu koncentrace K⁺ na 100 μM (Sentenac et al. 1992, Hirsch et al. 1998). Pokud je rostlina vystavena deficienci K⁺, objevují se ROS, které regulují aktivitu a transportní vlastnosti tohoto kanálu. Do této signální dráhy jsou zapojeny Ca²⁺ ionty. Ty aktivují vápník vazebné proteiny CBL (calcineurin B-like proteins) a následně kinázy CIPK (CBL-interacting protein kinase), které mají regulační schopnost (Xu et al. 2006). Ca²⁺ ionty jsou potřebné pro interakci CBL1/9 a CIPK23, aby mohlo dojít k fosforylaci AKT1 (Geiger et al. 2009). Výsledkem je přestavba AKT1 kanálu do podoby heterotetrameru, což mění jeho transportní vlastnosti a umožňuje mu zprostředkovávat příjem K⁺ i při velmi nízké externí dostupnosti (Duby et al. 2008). K deaktivaci AKT1 dochází za účasti CBL10 a fosfatázy PP2C (protein phosphatases 2C) (Lan et al. 2011, Sharma et al. 2013).



Obrázek č. 2 - Struktura kanálů rodiny Shaker a TPK (tandem-pore K⁺channel) (Sharma et al. 2013)

Další K^+ kanál z rodiny Shaker je kanál SPIK (shaker pollen inward K^+ channel), který je zapojen do příjmu K^+ pylovou láčkou a reguluje její vývoj a růst (Mouline et al. 2002).

Kanál SKOR (stellar K^+ -outward rectifying) je lokalizovaný v buňkách středního válce kořene. Pomáhá zprostředkovat transport K^+ z kořenů do nadzemích částí, podílí se na naložení K^+ do xylému (Gaymard et al. 1998).

V nakládání do floému je zapojen kanál AKT2/3, který je zřejmě zapojen především při nedostatku energie. U rostlin mutantních v tomto genu bylo pozorováno snížení hladiny sacharózy ve floémové šťávě. U těchto rostlin se projevilo i zpoždění kvetení a měly menší množství květních stvolů (Deeken et al. 2002).

Dalšími již zmíněnými draselnými kanály jsou KAT1 a KAT2, důležité při otevírání průduchů a zajišťující vtok K^+ přes PM svěřacích buněk. Dále také kanál GORK zapojený do procesu zavírání průduchů, zajišťující naopak výtok K^+ (Hosy et al. 2003). Tento kanál se může podílet také na výdeji K^+ do prostředí, díky jeho expresi v kořenových vláscích (Becker et al. 2003).

Rodina TPK

Další rodinou draselných kanálů je rodina TPK. Kanály spadající do této rodiny mají 4 transmembránové domény a fungují jako dimery (viz obrázek č. 2) (Lebaudy et al. 2007, Maîtrejean et al. 2011). Téměř všichni členové této rodiny jsou lokalizováni na vakuolární membráně (Czempinski et al. 2002). Existují však i výjimky, např. TPK4 je lokalizovaný na PM (Becker et al. 2004) a TPK3 na tylakoidní membráně (Zanetti et al. 2010). TPK kanály jsou obvykle exprimovány specificky v různých rostlinných orgánech nebo pletivech (Voelker et al. 2010). Na rozdíl od kanálů z rodiny Shaker se zdá, že u rodiny TPK neexistuje žádný senzor napětí, což naznačuje jejich slabou citlivost na změny membránových potenciálů. U některých TPK kanálů byly objeveny vazebné domény pro Ca^{2+} na C-terminálním konci v cytosolu, což ukazuje na jejich možnou regulaci Ca^{2+} signalizací (Lebaudy et al. 2007).

2.3.2 Rodiny rostlinných draselných přenašečů

Draselné transportéry (přenašeče) můžeme rozdělit do 4 rodin: KT/HAK/KUP, Trk/HKT (high-affinity K^+ transporter), KEA (K^+ efflux antiporter) a CHX (cation/hydrogen exchanger). Nejdůležitější rodinou je KT/HAK/KUP.

Rodina TrkHKT

U hub a bakterií fungují tyto transportéry jako H^+/K^+ a K^+/Na^+ symportéry. U rostlin však výzkumy naznačují, že pouze malá část funguje jako Na^+/K^+ symportéry (Rubio et al. 1995). Většina HKT transportérů u rostlin zajišťuje transport Na^+ (Gierth and Mäser 2007).

Rodina KEA

Mnoho transportérů z této rodiny je zapojeno v antiportu kationt/proton (Kunz et al. 2014). Např. K^+/H^+ antiporter KEA3, který je lokalizovaný na tylakoidní membráně a pomáhá vybalancovat tok kladně nabitých částic a tím udržet gradient protonů, aby nedošlo k hyperpolarizaci membrány a tím k narušení fotosyntézy (Höhner et al. 2016).

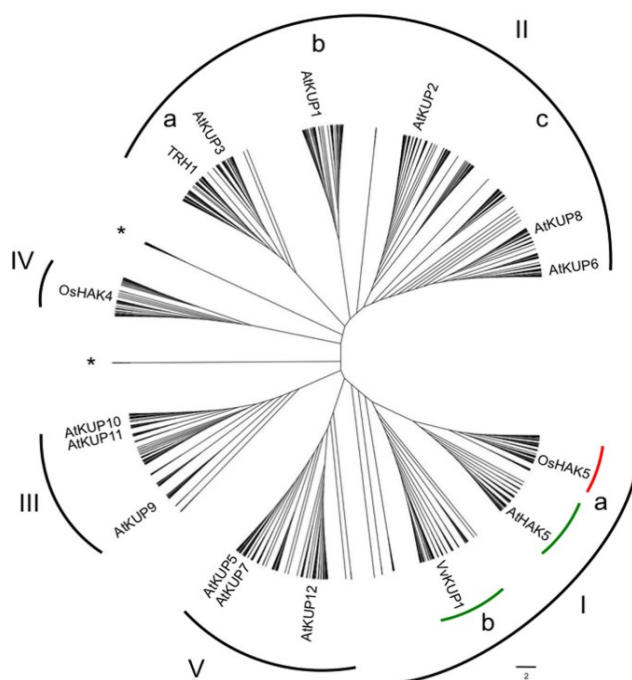
Rodina CHX

Většina členů této rodiny je identifikována jako Na^+/H^+ antiportéry a část jako K^+/H^+ antiportéry. Např. AtCHX17 je transportér zajišťující vtok K^+ . Je lokalizovaný na tonoplastu a na PM buněk kořene a společně s dalšími transportéry AtCHX16/18/19 je potřebný pro reprodukci a správný vývoj semen (Chanroj et al. 2013).

Rodina KT/HAK/KUP

U *Arabidopsis* mají proteiny této rodiny 12 – 15 transmembránových domén a z toho 11 je konzervovaných napříč celou touto rodinou (Gupta et al. 2008). Proteiny z rodiny KT/HAK/KUP jsou rozřazeny do 5 klastrů, kde již zmíněný transportér AtHAK5 spadá do klastru I, viz obrázek č. 3 (Nieves-Cordones et al. 2016).

HAK je klíčový pro příjem K^+ z prostředí při jeho nízké dostupnosti. Gen pro vysokoafinitní transportér HAK5 je v *Arabidopsis* exprimován při nízké koncentraci K^+ , naopak při



Obrázek č. 3 – Fylogenetický strom rodiny KT/HAK/KUP (Nieves-Cordones et al. 2016). At – *Arabidopsis thaliana*, Os – *Oryza sativa*, Vv – *Vitis vinifera*

dostatku K^+ je jeho exprese minimální. *HAK5* je exprimován především v rhizodermis, primární kůře a středním válci kořene. Nejvýraznější exprese je v postranních kořenech, zatímco nejnižší expresi vykazuje *HAK5* v kořenových špičkách (Gierth et al. 2005). Stejně jako u regulace kanálu AKT1 zřejmě i při regulaci tohoto transportéru hrají roli ROS, které se tvoří při vystavení rostliny stresu (Neill et al. 2002). ROS jsou produkovány různými oxidázami a peroxidázami, z nichž jedna – RCI3 (rarecoldinducible gene 3) je zapojena do indukce exprese genu *HAK5* (Kim et al. 2010). Do regulace exprese jsou však zapojeny i jiné látky, např. NH_4^+ v půdě, který ji potlačuje (Qi et al. 2008). Zajímavým faktem je, že nejen nedostatek K^+ , ale i NO_3^- a P indukují transkripci *HAK5*. Pouze deficiencie K^+ však následně vede k indukci příjmu K^+ kořeny pomocí transportéru HAK5. Zřejmě tedy dochází k posttranskripční regulaci HAK5, která je vyvolána nízkým K^+ . Druhou možností je, že indukce transkripce *HAK5* při nízké koncentraci NO_3^- a P souvisí s dosud neznámou funkcí tohoto genu. Tento experiment byl prováděn u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) i u rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*), což naznačuje, že posttranskripční regulace vysokoafinitního transportéru HAK5 probíhá zřejmě u mnoha druhů rostlin (Rubio et al. 2014). Aktivita HAK5 je ale regulována i na posttranslační úrovni. HAK5 je aktivován fosforylací, do které jsou podobně jako u AKT1 zapojeny CBL proteiny – senzory Ca^{2+} (Ragel et al. 2015).

U specializovaných rostlin nemusí transportér HAK5 fungovat pouze v kořenech. Masožravé rostliny využívají živiny, včetně K^+ , také z těl kořisti, kterou natráví pomocí svých žláz. U mucholapky podivné je DmHAK5 společně s dalšími transportéry jako je např. AKT1 zapojen do příjmu K^+ z natrávené kořisti (Scherzer et al. 2015).

Dalším transportérem rodiny KT/HAK/KUP je KUP4/TRH1, který je kromě transportu K^+ schopen regulovat transport auxinu a ovlivňuje tímto způsobem např. růst kořenových vlásků (Rigas et al. 2001). Pokud jsou rostliny *Arabidopsis* mutantní v tomto genu, je u nich narušena správná distribuce auxinu v kořenech, s tím i gravitropismus kořene a rozvoj kořenových vlásků (Vicente-Agullo et al. 2004). KUP4 je v podobě dimeru schopen transportovat auxin přímo (Daras et al. 2015). Exprese genu *KUP4* byla pozorována v buňkách kolumely a laterální kořenové čepičky (Vicente-Agullo et al. 2004).

KUP6 je přenašečem, který je lokalizován na PM a zřejmě zajišťuje transport K^+ v různých částech rostliny. *KUP6* je exprimován v kořenové špičce, pericyklu a svěracích buňkách průduchů. Transportér KUP6 spolu s blízkými příbuznými transportéry KUP8 a KUP2 a kanálem GORK hrají zřejmě významnou roli v osmoregulaci. To se projevuje nejenom v růstu rostliny, ale i v reakci rostliny na stres ze sucha. Trojití mutanti *kup2/6/8*

a *kup6/8/gork* vykazovali za kontrolních podmínek zvýšený objemový růst buněk. Mutanti měli větší listy a větší rozměr jednotlivých buněk mezofylu. Vykazovali také zvýšenou citlivost k auxinu v růstu postranních kořenů, zatímco za sníženého množství vody špatně reagovali na signál k zavření průduchů a tím se snížila tolerance rostliny k suchu. Z těchto dat můžeme usuzovat, že transportéry KUP2, 6, 8 transportují K^+ do apoplastu, a tím přispívají k zavírání průduchů a omezení objemového růstu buněk (Osakabe et al. 2013).

Gen *KUP7* kóduje protein lokalizovaný na PM, zapojený do příjmu K^+ a jeho translokace v kořenech v K^+ deficientních podmínkách. Pokud v těchto podmínkách KUP7 nefunguje, jak bylo ukázáno na *kup7* mutantních rostlinách huseníčku, dojde ke snížení příjmu K^+ a obsahu K^+ v xylémové šťávě (Han et al. 2016). Bylo zjištěno, že KUP7 má funkční katalytickou doménu adenylátcyklázy (AC), která katalyzuje vznik cAMP (cyklický adenosin 3', 5' monofosfát) z ATP (adenosin 5' trifosfát) (Al-Younis et al. 2015). Molekula cAMP je důležitá signální molekula živých organismů. Význam této aktivity není nicméně ještě vyjasněn.

Ačkoliv se věda posouvá neustále kupředu, stále není zcela známá přesná struktura a funkce všech transportérů rodiny KT/HAK/KUP. Stále není zcela znám mechanismus funkce těchto transportérů a to jakým způsobem přispívají k homeostáze K^+ na úrovni buňky i celé rostliny (Al-Younis et al. 2018). To platí i pro transportér KUP5, kterému se věnuji ve své diplomové práci.

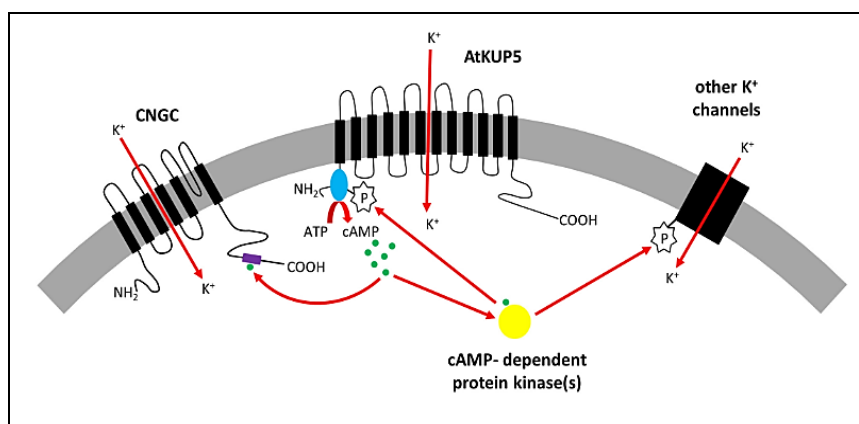
2.4 KUP5

Jak již bylo zmíněno výše, protein KUP5 patří do rodiny KT/HAK/KUP a nachází se v klastru V, společně s transportérem KUP7. Oba geny jsou si velmi strukturně podobné, ale zapojení KUP5 v transportu K^+ v rostlině zatím nebylo popsáno a není jasná ani jeho přesná lokalizace v buňce. Některé dřívější práce naznačily, že proteiny KUP4, KUP5 a KUP7 jsou vakuolární proteiny (Jaquinod et al. 2007). KUP7 byl ale později lokalizován na PM pomocí translační fúze s GFP (Han et al. 2016). Pro KUP5 tyto experimenty zatím chybí. Podobností proteinu KUP7 s proteinem KUP5 je, že má katalytické místo pro adenylátcyklázu (AC), nacházející se na N-terminálním konci směřujícím do cytosolu (Al-Younis et al. 2015, 2018). Co se týče role KUP5 v transportu K^+ , bylo zatím dokázáno, že mutanti *Saccharomyces cerevisiae* s narušeným transportem K^+ (*trk1*, *trk2*) jsou schopni přijímat K^+ , pokud je v nich exprimován gen kódující protein AtKUP5. Tento experiment tedy ukazuje schopnost transportéru KUP5 transportovat K^+ do buňky. Pokud je však narušena jeho AC aktivita,

KUP5 není schopen K^+ transportovat, což naznačuje nezbytnost AC domény pro absorpci K^+ (Al-Younis et al. 2018).

Na obrázku č. 4 můžeme vidět model, který ukazuje možnou roli transportéru AtKUP5 v udržování homeostáze K^+ . AtKUP5 transportuje K^+ do buňky, kde se generuje cAMP přes jeho cytosolickou N-terminální adenylátcyklázovou doménu. Tento cAMP se může vázat na vazebnou doménu kanálů CNGC (cyclic nucleotide gated channels), které jsou prostřednictvím cAMP regulovány a jsou schopné také transportovat K^+ do buňky. Vzniklé cAMP se také může vázat na kinázy závislé na cAMP, které mohou fosforylovat jiné K^+ kanály nebo AtKUP5 a dále ovlivňovat homeostázi K^+ (Al-Younis et al. 2018).

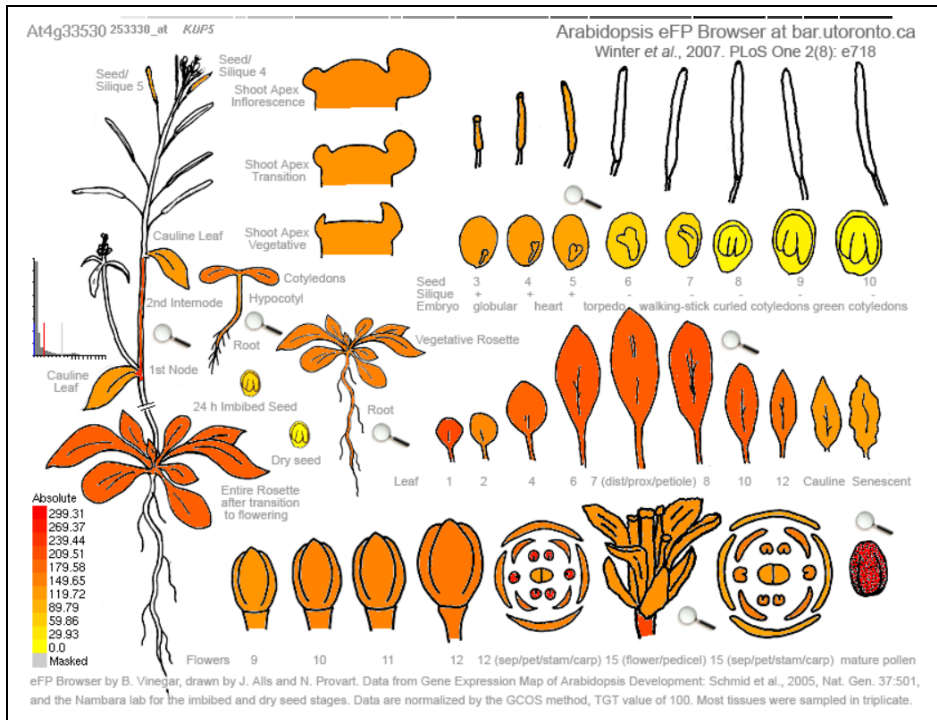
V tomto výzkumu bylo také prokázáno, že AC doména AtKUP5 může nahradit AC gen u mutanta *Escherichia coli*, který postrádá svůj endogenní AC gen (gen *cyaA*). Tento mutant je deficientní v AC aktivitě, po transformaci je nicméně schopný produkovat cAMP (Al-Younis et al. 2018). To prokazuje funkčnost AC domény AtKUP5 proteinu.



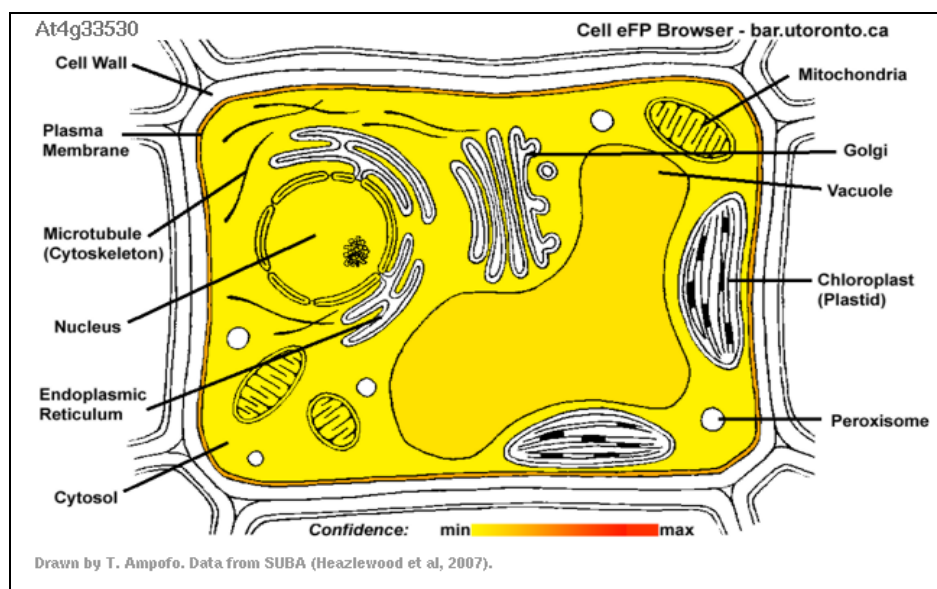
Obrázek č. 4 – Model zobrazující roli AtKUP5 v K^+ homeostázi. AtKUP5 transportující K^+ do buňky a následně tvořící cAMP. (Al-Younis et al. 2018)

Expresí *KUP5* v rámci rostliny není zcela jasná. V jednom z experimentů byla analyzována exprese *KUP5* pomocí RT-PCR (realtime polymerase chain reaction) u týdenních semenáčků a šestitýdenních rostlin huseníčku. Při měření u týdenních rostlin byla exprese *KUP5* zaznamenána pouze v kořenových vláscích. Expresí u takto mladých rostlin nebyla zaznamenána v kořenech ani v listech. Dále byla analyzována exprese *KUP* genů v celé rostlině u kvetoucích, šest týdnů starých rostlin huseníčku pěstovaných v médiu s dostatečným množstvím K^+ . V tomto experimentu byla zaznamenána exprese *KUP5* v kořenech, ale nejvyšší exprese byla v mladých listech (Ahn et al. 2004). Gen *KUP7* vykazoval shodný trend jako gen *KUP5* v relativní expresi ve všech částech rostliny, exprese však byla vyšší než u genu *KUP5*. Na rozdíl např. od genu *HAK5*, který při vysokých koncentracích K^+ vykazoval téměř nulové hodnoty. U genů *KUP6*, *KUP8* a *KUP9* značně převládala exprese v mladých listech. Hladina exprese jednotlivých genů byla měřena na základě množství mRNA (Ahn et al. 2004).

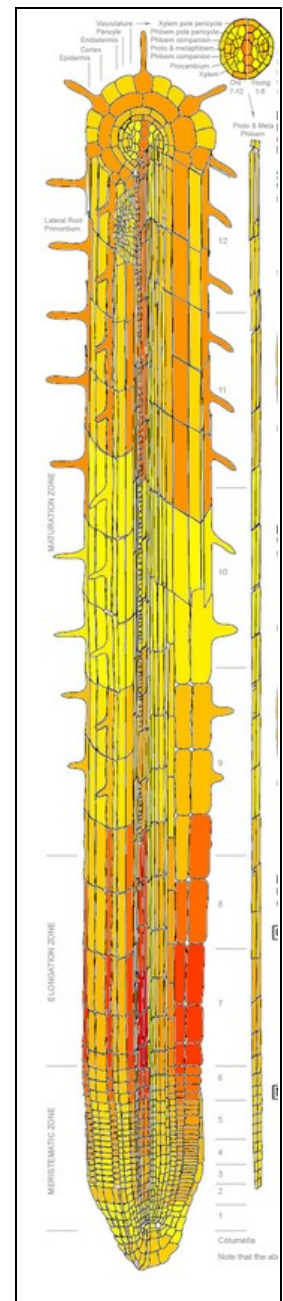
Dle *Arabidopsis* eFP Browser (Winter et al. 2007) naznačují recentní čipová data expresi *KUP5* v celé rostlině (obrázek č. 5). V nadzemní části rostliny se exprese předpokládá téměř ve všech částech, v kořeni pak především v elongační zóně (viz obrázek č. 7). Na buněčné úrovni je dle Cell eFP Browser (Winter et al. 2007) lokalizace proteinu předpokládána především na PM (viz obrázek č. 6).



Obrázek č. 5 – Expresa *KUP5* v nadzemní části rostliny dle *Arabidopsis* eFP Browser (Winter et al. 2007)



Obrázek č. 6 – Předpokládaná lokalizace *KUP5* v buňce dle Cell eFP Browser (Winter et al. 2007)



Obrázek č. 7 – Předpokládaná exprese *KUP5* v kořeni (Winter et al. 2007)

2.5 Transportéry KT/HAK/KUP v jiných rostlinných druzích

Funkce transportérů rodiny KT/HAK/KUP je postupně charakterizována i v dalších rostlinných druzích. Významných pokroků bylo dosaženo především u rýže. Exprese *OsHAK5* byla zaznamenána napříč rostlinných tělem, silná exprese byla zaznamenána především v rhizodermis a stélé kořenů, vodivých pletivech a buňkách mesofylu (Yang et al. 2014). Lokalizace tohoto transportéru byla pozorována na PM (Horie et al. 2011). *OsHAK5* zajišťuje vtok K^+ do buněk kořenů a transport K^+ z kořenů do nadzemních částí. V situaci, kdy byl *OsHAK5* nefunkční došlo k narušení vtoku K^+ do buněk a narušení transportu K^+ v rostlině. Oproti tomu, pokud byla zvýšena exprese tohoto genu, došlo ke zvýšení akumulace K^+ a Na^+ v nadzemních částech rostliny (Yang et al. 2014). *OsHAK5* tedy hraje hlavní roli při získávání K^+ pomocí kořenů a při transportu K^+ z kořenů do nadzemních částí za nízké koncentrace K^+ v půdě a rovněž přispívá k odolnosti k zasolení (Horie et al. 2011, Yang et al. 2014).

U rýže byl dále popsán transportér *OsHAK1*. Exprese genu *OsHAK1* je pozitivně regulována nedostatkem K^+ nebo solným stresem. Exprimuje se v různých pletivech, zejména však v apikálním meristému kořene a prýtu, epidermálních buňkách, ve stélé kořene a ve vodivých pletivech prýtu. Mutanti v tomto genu vykazovali sníženou koncentraci K^+ a zakrnělý růst kořenů i prýtu. Mutantní rostliny byly také více citlivé na stres ze zasolení (Chen et al. 2015b).

Dalším transportérem, který přispívá k odolnosti k zasolení je transportér *OsHAK21*, který je lokalizovaný na PM. *OsHAK21* je exprimován především v parenchymu xylému a endodermálních buňkách. Pokud byla narušena funkce tohoto transportéru, došlo u mutantů k nižší akumulaci K^+ a vyšší akumulaci Na^+ v kořenech i v nadzemních částech oproti rostlinám divokému typu a mutanti byli citlivější ke stresu ze zasolení. Tato pozorování naznačují, že *OsHAK21* může zprostředkovávat absorpci K^+ přes PM a hrát roli při udržení homeostáze Na^+/K^+ u rostlin rýže, které jsou vystaveny stresu ze zasolení (Shen et al. 2015).

U rýže byl také proveden experiment propojující auxin-cytokininovou signalizaci, která reguluje proliferaci buněk a gen *OsHAK16*. Do rostlin rýže byl vnesen konstrukt *pOsHAK16:WOX11*. Následně byly transgenní rostliny pěstovány za snížené koncentrace K^+ . Díky tomu vzrostla exprese genu *OsHAK16*, který je pozitivně ovlivňován deficiencí K^+ (Okada et al. 2008). Současně byl ve vyšší míře exprimován i vnesený konstrukt s kódující sekvencí genu *WOX11* (*WUSCHEL*-related Homeobox 11), což je jeden z genů auxin-cytokininové signalizace. Pokud nastalo zvýšení exprese *OsHAK16* a tedy i *WOX11*, došlo

k nárůstu biomasy kořenového systému a ke zvýšení počtu adventivních kořenů. Transgenní rostliny ve srovnání s divokým typem vykazovaly, při nízké dostupnosti K^+ , vyšší koncentraci K^+ v celé rostlině a vyšší koncentraci rozpustných cukrů v kořenech. Je zajímavé, že tohoto pozitivního efektu nebylo možno dosáhnout spojením *WOX11* genu s ubiquitinovým protomorem (Zhao et al. 2009).

Exprese *pOsHAK16:WOX11* u rostlin pěstovaných v půdě s mírným deficitem K^+ zvýšila celkový příjem K^+ o 72 % a výtěžek zrn vzrostl o 24 – 32 %. Výzkum tedy naznačuje, že zvýšení růstu a vývoje kořenů díky expresi *WOX11* ve vazbě na signalizaci nedostatku K^+ by mohlo vést ke zvýšení účinnosti pěstování a vyšší produkci obilnin v půdách s nízkou dostupností K^+ (Chen et al. 2015a)

Experimenty u kukuřice ukázaly podobné výsledky jako u rýže. Transportér *ZmHAK5* byl charakterizován jako vysokoafinitní transportér K^+ , lokalizovaný na plazmatické membráně a zajišťující příjem K^+ do buňky. *In situ* hybridizace *ZmHAK5* u kukuřice ukázala dominantní expresi v kořenech. Na úrovni pletiv je exprese zejména v buňkách rhizodermis, primární kůry a ve vodivých pletivech. Pokud došlo k narušení funkce transportéru *ZmHAK5*, byl snížen příjem K^+ za K^+ deficientních podmínek. Naopak rostliny kukuřice, u kterých byla zvýšena exprese *ZmHAK5*, vykazovaly vyšší absorpci K^+ a lepší růst při nedostatku K^+ (Qin et al. 2019). Je tedy pravděpodobné, že *ZmHAK5* je důležitý pro příjem K^+ z prostředí při jeho nízké dostupnosti, podobně jako *AtHAK5* u huseníčku (Gierth et al. 2005). Exprese *ZmHAK5* však na rozdíl od *AtHAK5* není stimulována nedostatkem K^+ (Qin et al. 2019).

Dalším transportérem rodiny KT/HAK/KUP, který byl u kukuřice charakterizován, je *ZmHAK1*. Exprese genu *ZmHAK1* je výraznější v prýtu oproti kořenům a je stimulována nedostatkem K^+ . Při zvýšené expresi *ZmHAK1* se narušuje distribuce K^+ v nadzemní části, což vede k chlorózám starších listů. Obsah K^+ v mladších listech je však vyšší oproti kontrolním rostlinám, což značí možné narušení distribuce K^+ u těchto rostlin. *ZmHAK1* se tedy zřejmě podílí na re-translokaci K^+ ze starších do mladších listů. (Qin et al. 2019).

U ječmene byl objeven vysokoafinitní transportér *HvHAK1*, jehož gen je exprimován pouze v kořenech a exprese tohoto genu je zvýšena nejméně 5x u rostlin trpících nedostatkem K^+ . Tento transportér zajišťuje příjem K^+ v kořenech a byla u něj zaznamenána nízká afinita k Na^+ (Santa-maría et al. 1997). Dalším popsáným transportérem rodiny KT/HAK/KUP mimo *Arabidopsis* je *SiHAK1* u bérů italského (*Setaria italica*). *SiHAK1* je za dostatečné dostupnosti K^+ exprimovaný v různých pletivech rostliny (prýtu i kořenech), při nízké dostupnosti K^+ je výrazně up-regulován pouze v nadzemní části. Musí být tedy regulován především vnitřním K^+ statusem rostliny. *SiHAK1* je lokalizovaný na plazmatické membráně

buněk epidermis listu a zajišťuje vysokoafinitní transport K^+ zřejmě především při nízké dostupnosti K^+ (Zhang et al. 2018).

3 Metodika

3.1 Rostlinný materiál, kultivační podmínky a genotypování

Jako rostlinný materiál byla použita linie T-DNA inzerčních mutantů modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Pro propagaci a křížení byly tyto rostliny vysazovány na rašelinové tablety (Jiffy) do kultivační místnosti, kde byla teplota 23 °C, relativní vlhkost 45 % a fotoperioda zde byla 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Pro křížení a transformace byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypy Columbia (Col-0 a Col-8) a homozygotní mutanti *rdr6* (RNA dependentní RNA polymeráza 6) (Boccaro et al. 2014). Tyto rostliny byly pěstovány na rašelinových peletách.

Všechn rostlinný materiál byl pěstován také *in vitro* na 0,2xMS médiu, tedy modifikovaném MS (Murashige-Skoog) médiu s koncentrací živin sniženou na 1/5 (viz dále) v Petriho miskách o rozměrech 10x10 cm. Pro experimenty hodnotící růst rostlin v různých podmínkách bylo toto médium dále modifikováno (viz kapitola 3.2.). Kultivace probíhala při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy, při teplotě 21 °C.

T-DNA linie *Arabidopsis thaliana*

Pro všechny experimenty byla použita T-DNA inzerční linie *Arabidopsis thaliana* SALK_120707. Tato linie nese inzerci T-DNA v 5. exonu (z celkových deseti exonů) genu *AtKUP5* (At4g33530) Semena pro tuto linii byla objednána z NASC (The European *Arabidopsis* Stock Centre) (Scholl et al. 2000).

Po ověření T-DNA inzerce pomocí PCR genotypování byla linie křížena s divokým typem *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-8 (kód NASC: N60000), který je ekotypem použitým pro přípravu T-DNA inzerčních linií. Toto křížení provedl Mgr. Marek Šustr. Z F2 generace jsem opět pomocí PCR genotypování vyseletovala divoký typ (homozygotní rostliny kontrolního genotypu, wild-type) i homozygotně mutantní rostlinu s T-DNA inzercí. Na těchto rostlinách byly posléze prováděny fenotypové experimenty.

Ověření přítomnosti T-DNA inzerce genotypováním

Rostliny byly kultivovány při podmínkách uvedených v kapitole 3.1. Dále byly rostliny zpracovány dle následujících postupů.

Izolace genomové DNA z listů *Arabidopsis thaliana*

Izolace DNA z listů byla prováděna dle protokolu (Edwards et al. 1991). Pro izolaci byly odebírány cca 0,5 cm velké části mladších listů. Odebraná část listu byla vložena do 2 ml zkumavky „Safelock“ společně s mlecí kuličkou. Zkumavka byla ponořena do tekutého dusíku. Poté došlo k vychlazení kazety vibračního mlýnu a vložení zkumavek s odebranými částmi listů. Vychlazené kazety byly upevněny do vibračního mlýnu (Retsch MM301) a listy byly homogenizovány po dobu 30 sekund při 30 kmitech za sekundu. K homogenizované směsi bylo přidáno 200 μ l extrakčního pufru (viz tabulka č. 1). Směs byla vortexována po dobu 5 sekund a byla z ní vyndána mlecí kulička. Směs byla poté centrifugována 2 minuty při maximální rychlosti (14000 ot./min.). Dále byl supernatant (180 μ l) přenesen do nové zkumavky a bylo k němu přidáno stejné množství izopropanolu. Nejdříve byla směs promíchána pipetováním, poté nechána stát 2 minuty při laboratorní teplotě a následně centrifugována při 14000 ot./min. po dobu 4 minut. Dále došlo k odsátí supernatantu pomocí vodní vývěvy a peleta byla promyta 1 ml 70% etanolu. Tato směs byla centrifugována po dobu 5 minut při 14000 ot./min. Supernatant byl opět odsán pomocí vodní vývěvy a pelety byly vysoušeny několik minut při laboratorní teplotě. Peleta byla rozpuštěna v 10 μ l 10x TE pufru a 90 μ l destilované H₂O. Složení TE pufru: 1 M Tris 1 ml, 0,5 M EDTA 0,2 ml, zbytek do 100 ml doplněn dH₂O. Vzorky byly skladovány v lednici při 4 °C.

Izolovaná DNA byla následně využita v polymerázové řetězové reakci (PCR) pro detekci kontrolní a mutantní alely daného genu. Pro tuto detekci byly použity genotypovací primery uvedené v tabulce č. 2. Detekce kontrolní alely byla provedena za pomoci RP a LP primeru (vzniká produkt o délce cca 1200 bp), detekce mutantní alely byla provedena za pomoci RP a LB primeru (vzniká produkt o délce 700 bp).

Komponenta	Koncentrace zásobního roztoku	Použité množství
Tris HCL, pH = 7,5	200 mM	20 ml
NaCl	250 mM	5 ml
EDTA	25 mM	5 ml
SDS	0,5%	5 ml
dH ₂ O		Doplnit do 100 ml

Tabulka č. 2 – Primery použité pro genotypování kontrolní a mutantní alely. Design primerů dle SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

Primery	Označení	Sekvence
KUP5	RP	CAGCAAGAGGCAAGGTAACAC
KUP5	LP	TCCCAAATCAACTTCCATCAG
SALK	LB	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro ověření přítomnosti či nepřítomnosti T-DNA v cílovém genu mutantní linie se využívá polymerázová řetězová reakce. Celkový objem reakce byl 20 μ l, složení použité reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 3. V polymerázové řetězové reakci dochází nejprve k denaturaci DNA, kdy se jednotlivá vlákna oddělují od sebe. Poté dojde k asociaci primerů s denaturovanou DNA, díky snížení teploty na hodnotu optimální pro konkrétní primery (určeno pomocí Tm Calculatoru, www.thermofischer.com). Dále dochází ke zvýšení teploty, aby došlo k aktivaci polymerázy, která syntetizuje komplementární vlákno podle templátového vlákna. Tyto cykly se opakují cca 25–30x.

Průběh jednotlivých PCR cyklů je shrnut v tabulce č. 4. Produkt PCR je použit pro další práci, vyhodnocení přítomnosti inzerční T-DNA.

PCR byly prováděny v Thermo cycleru (Biometra).

Tabulka č. 3 – Složení reakční směsi

Komponenta	Koncentrace zásobního roztoku	Použité množství (μ l)
Izolovaná DNA	-	1
Taq DNA polymeráza (Thermo Scientific)	5 U/ μ l	0,04
dNTP	10 mM	0,4
Primer RP	20 μ M	1
Primer LP/LB	20 μ M	1
Taq reakční pufr	10x koncentrovaný	2
dH ₂ O		14,56

Tabulka č. 4 – Nastavení Thermo cycleru pro genotypování.

Fáze cyklu	Teplota	Čas (min.)
Iniciální denaturace	94 °C	2:00
Denaturace	94 °C	0:30
Nasedání primerů	52 °C	0:30
Syntetická fáze	72 °C	1:00
Terminální syntetická fáze	72 °C	10:00
Ochlazení	4 °C	∞

} 28x

Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza se využívá k rozlišení fragmentů DNA podle jejich délky. Nejčastěji byl využíván gel s obsahem agarózy 1,2 %. Pro lepší rozlišení krátkých fragmentů DNA byl využit gel s obsahem agarózy 2 %. Gel byl připraven smícháním 1,2 % w/v agarózy a 0,5x koncentrovaného TAE pufru (viz tabulka č. 5). Tato směs byla rozvařena a poté bylo dodáno barvivo GelRed (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain), nezbytné pro následnou vizualizaci fragmentů DNA. GelRed byl do směsi přidáván v koncentraci 5 µl na 100 ml 0,5x TAE. Poté byl roztok rozlit do forem s hřebenem a ponechán při pokojové teplotě, aby zatusnul.

Pro elektroforézu byly využívány vany o různých rozměrech, ve kterých byl pufr 0,5x TAE. Vzorky byly vkládány do jamek již smíchané s nanášecí barvičkou (viz tabulka č. 6). Pro určení délky fragmentů byl do jedné z jamek přidán i DNA marker (1 kb marker GeneRuler™). Oddělování fragmentů DNA daných vzorků bylo prováděno v elektrickém poli při různém napětí (rozmezí 70 – 120 V), v závislosti na objemu vany.

Komponenta	Koncentrace zásobního roztoku	Použité množství
TRIS base		121 g
EDTA (pH = 8)	0,5 M	50 ml
Kyselina octová ledová	99,8 %	28,5 ml
dH ₂ O		Doplnit do 500 ml

Komponenta	Koncentrace zásobního roztoku	Použité množství
Tris HCl (pH = 7,6)	100 mM	5 ml
Bromferolová modř		0,015 g
EDTA (pH = 8)	0,5 M	6 ml
Glycerol	99 % (v/v)	30,24 ml
dH ₂ O		Doplnit do 50 ml

3.2 Růstová analýza T-DNA inzerčních mutantů

Kultivace rostlin *in vitro* na agarových miskách

Semena byla sterilizována pomocí roztoku 20% chlornanu sodného (SAVO) a 1% tritonu po dobu 15 minut. Následně byla semena třikrát opláchnuta sterilní destilovanou vodou po dobu 1 min. Veškerá tato práce probíhala za sterilních podmínek ve flow boxu (laminární box). Semena po sterilizaci byla ponechána po dobu 3 dní v destilované vodě při 4 °C v lednici. Poté byla semena ve velkém množství vyseta na pevné kultivační 0,2xMS médium v Petriho miskách. Petriho misky byly umístěny ve stojácích pod úhlem 45° do kultivační místnosti s teplotou 21 °C a fotoperiodou 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Následně byly rostliny s 1 cm

dlouhým kořenem sterilně přeneseny na nové kultivační médium, podle požadovaných experimentálních podmínek a vráceny do kultivační místnosti. Díky přesazení byla snížena variabilita růstu rostlin způsobená rozdíly v klíčivosti semen.

Kultivační média

Pro předpěstování byla využívána 0,2xMS média s přidavkem 1% w/v agaru a 1% w/v sacharózy (médium s obsahem všech minerálních živin odpovídající 5x zředěné koncentraci živin v Murashige a Skoog médiu); složení viz tabulka č. 7. Pro hodnocení fenotypových rozdílů při různých podmínkách byly rostliny přesazovány na média s různými variantami stresových faktorů. Rostliny byly vystaveny podmínkám deficiencie K^+ (varianta - K^+), kde byly roztoky KNO_3 a KH_2PO_4 nahrazeny roztoky $NaNO_3$ a NaH_2PO_4 a K^+ byl pomocí KCl doplněn na koncentraci 30 μM , přičemž byl zohledněn K^+ pocházející přímo z agaru. Dalšími variantami byly vyšší salinita, kde bylo použito 50 mM $NaCl$ a varianta s pevnějším médiem hůře poskytujícím vodu, kde byla zvýšena koncentrace agaru na 1,5 % w/v.

Komponenta	Koncentrace v kultivačním roztoku (μM)					
	0,2xMS médium	0,2xMS + 1,5% agar	0,2xMS + 50 mM NaCl	- K^+	- K^+ + 1,5% agar	- K^+ + 50 mM NaCl
KNO_3	3758,65	3758,65	3758,65	0,00	0,00	0,00
KH_2PO_4	249,83	249,83	249,83	0,00	0,00	0,00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	300,18	300,18	300,18	300,18	300,18	300,18
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	598,56	598,56	598,56	598,56	598,56	598,56
Na_2 -EDTA	20,02	20,02	20,02	20,02	20,02	20,02
H_3BO_4	20,05	20,05	20,05	20,05	20,05	20,05
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
$FeSO_4 \cdot 5H_2O$	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
$MnSO_4$	22,38	22,38	22,38	22,38	22,38	22,38
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
KI	0,00	0,00	0,00	30,00	30,00	30,00
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98
$NaCl$	0	0	50000	0	0	50000
$NaNO_3$	0	0	0	3752,94	3752,94	3752,94
NaH_2PO_4	0	0	0	250,04	250,04	250,04

Fenotypová analýza kořenového systému a její vyhodnocení

Petriho misky, ve kterých byly pěstovány rostliny *in vitro* podmínkách, byly posléze skenovány pomocí skeneru (Epson V800 Photo) cca 5. den po přesazení, kdy kořeny vyplňovaly většinu Petriho misky, ale ještě se nedotýkaly jejího spodního okraje. Snímání kořenů probíhalo při rozlišení 1200 dpi a 48bitových barvách.

Kořeny byly měřeny pomocí programu Root Analyzer v Nis Elements (NIS-Elements AR 3.2 64bit). Byla hodnocena celková délka kořenového systému, délka postranních kořenů a jejich počet. Rostliny byly také pozorovány pomocí binolupy SZX7 a byl hodnocen fenotyp kořenových vlásků.

Rostliny byly dále ponechány růst až do 15. dne, kdy byl proveden odběr biomasy. Rostliny byly rozděleny na prýt a kořeny a byla zvážena čerstvá hmotnost obou částí. Po vysušení při 60 °C byla zvážena také suchá hmotnost, dopočítán R/S poměr a obsah vody v biomase.

Statistické vyhodnocení

Pro vyhodnocení naměřených výsledků byl použit program NCSS 9 Statistical Software. Vliv genotypu a jednotlivých variant kultivací byly vyhodnoceny pomocí dvouvýběrové GLM (general linear models) ANOVY a Bonferroni Multiple Comparison testu. Rozdíly mezi genotypy v jednotlivých variantách kultivace byly vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney U T-testu.

3.3 Příprava rostlin nesoucích translační a transkripční fúze

Bakterie

Pro přípravu transformace rostlin byla využita metoda Multisite Gateway®. Vektory byly množeny pomocí bakterií *Escherichia coli* (DH5α). Kultivace bakterií probíhala na tuhém a tekutém LB médiu (viz tabulka č. 8), při 37 °C cca 15 hodin. K médiu bylo přidáváno odpovídající antibiotikum.

Komponenta	Použité množství	
	Tekuté LB médium	Tuhé LB médium
Pepton	10 g/l	10 g/l
Kvasničný extrakt	10 g/l	10 g/l
NaCl	10 g/l	10 g/l
Agar (KOBÉ)	-	15 g/l
dH ₂ O	Do požadovaného objemu	Do požadovaného objemu

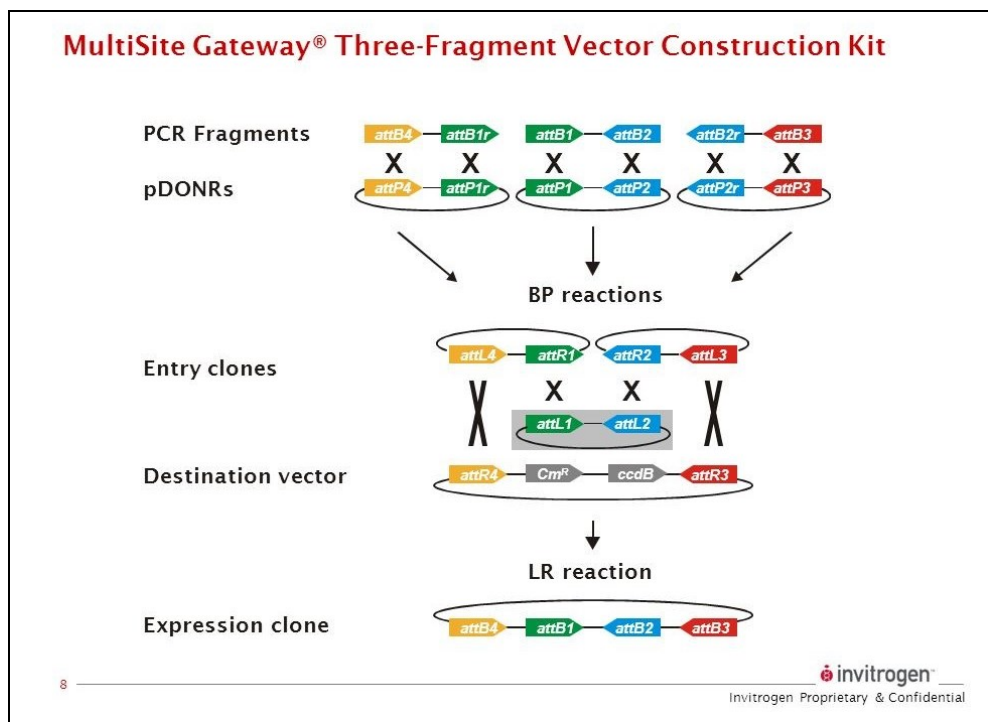
Pro transformaci bylo použito *Agrobacterium tumefaciens* (kmen GV3101), které bylo stejně jako *E.coli* kultivováno na tuhém i tekutém LB médiu viz tabulka č. 8. Pro udržení schopnosti transformace a aby došlo k selekci transformovaných bakterií byla do LB média přidána specifická antibiotika - rifampicin v koncentraci před ředěním 10 mg/l (ředěné 1:1000), gentamycin v koncentraci před ředěním 10 mg/ml (ředěné 1:100), spectinomycin v koncentraci před ředěním 50 mg/ml (ředěné 1:100). Bakterie byly kultivovány 24 – 48 hodin při teplotě 28 °C.

3.3.1 Metoda transformace a design konstruktů

Multisite gateway system

Prvním krokem bylo připravit konstrukt *in silico* pomocí programu Geneious 11.0.5 (Biomatters). Pro gen *KUP5* byla takto připravena transkripční i translační fúze pomocí výše zmíněné techniky Multisite Gateway®, ve které dochází ke skládání několika fragmentů DNA do daných vektorů. Technika Multisite Gateway® spočívá ve dvou po sobě následujících krocích. Nejprve jsou amplifikovány vybrané sekvence DNA (promotorová a kódující oblast genu) pomocí PCR s primery obsahujícími potřebné adaptorové sekvence. Tyto fragmenty DNA jsou následně vneseny do donorových vektorů pomocí BP klonázové reakce za vzniku Entry clone vektorů. Následně jsou fragmenty poskládány za sebe do výsledného konstruktů pomocí LR reakce, kdy se kombinují Entry clone vektory a destinační vektor za vzniku Expression clone vektoru pro transformaci rostlin (viz obrázek č. 8). Transkripční a translační fúze pro gen *KUP5* byla vytvořena ze třech fragmentů, jako je naznačeno na obrázku č. 8.

Potřebné sekvence genu *KUP5* byly získány pomocí aplikace SIGnAL iSEC Tool (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory; <http://signal.salk.edu/isect.2.html#Region>). Oblast promotoru byla použita v délce 2000 bp.



Obrázek č. 8 – Schéma skládání fragmentů technikou Mutisite Gateway® (<https://thermofisher.com>)

Design translační fúze KUP5 pro Multisite Gateway®

Translační fúze KUP5 s fluorescenčním proteinem GFP (green fluorescent protein) na C konci (viz obrázek č. 9) byla vytvořena ve dvou verzích, pod nativním promotorem a pod promotorem 35S. Pro translační fúzi KUP5 pod nativním promotorem byla provedena amplifikace promotorové i kódující oblasti genu *KUP5*, z genomové DNA pomocí PCR (viz část amplifikace kap. Amplifikace). Pro translační fúzi KUP5 pod 35S promotorem byla použita již amplifikovaná kódující oblast genu *KUP5*. Primery použité pro amplifikaci jsou uvedeny v tabulce č. 9. Primery obsahovaly potřebné adaptorové sekvence nezbytné pro vložení do donorových vektorů Multisite Gateway® systému.

Tabulka č. 9 – Primery použité pro amplifikaci translačních fúzí	
<i>KUP5</i> cds forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA ATGTTTCACGTGGAAGAAGAA (červeně označena adaptorová sekvence attB1)
<i>KUP5</i> cds reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TACCATATAAGTCATTCCAAGTGC (červeně označena adaptorová sekvence attB2)
<i>KUP5</i> prom forward	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCT ATCCACAATGAAAACGCCCT (červeně označena adaptorová sekvence attB4)
<i>KUP5</i> prom reverse	GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGC CAATCACCGTTGGAAAACACTGAAG (červeně označena adaptorová sekvence attB1r)



Obrázek č. 9 – Konstrukt translační fúze KUP5 pod nativním promotorem

Amplifikované úseky DNA byly nejprve vloženy do vstupních vektorů MultisiteGateway systému. Promotorová sekvence byla vložena do vektoru pDONR221 P4P1r, kódující sekvence do vektoru pDONR221 (viz kap. BP reakce). Dále byly namnoženy a ověřeny získané Entry Clone vektory a byla provedena LR reakce s vektorem pEN-R2-F-L3 nesoucím fluorescenční protein GFP a destinačním vektorem pB7m34GW nesoucím rezistenci vůči herbicidu BASTA (viz kap. LR reakce). Tím byl získán Expression clone vektor pro transformaci rostlin, který byl namnožen a ověřen.

Stejně bylo postupováno i v translační fúzi s 35S promotorem. Jediným rozdílem bylo použití vektoru pEN-L4-2-R1, nesoucího sekvenci pro 35S promotor.

Přesný postup přípravy vektorů je popsán v následující kapitole 3.3.2. Jednotlivé vektory jsou zobrazeny na obrázku č. 10 – č 15 v kap. Vektory.

Design transkripční fúze KUP5 pro Multisite Gateway®

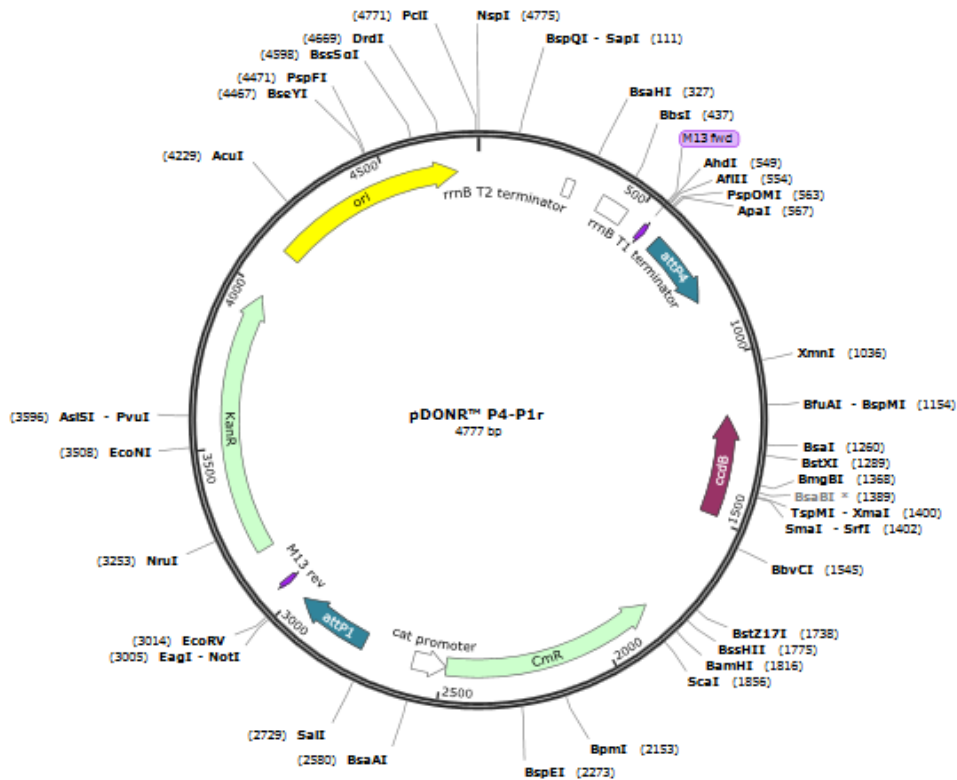
Transkripční fúze představovala konstrukt kódující sekvence reportérového genu pro enzym GUS (β -glukuronidázou) transkripčně spojeného s nativním promotorem genu *KUP5*. Použité primery včetně adaptorových sekvencí jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10 – Primery použité pro transkripční fúzi	
Primery	Sekvence
KUP5 prom forward	GGGGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGCT ATCCACAATGAAAAACGCCCT (červeně označena adaptorová sekvence attB4)
KUP5 prom reverse	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGC CAATCACCGTTGGAAAACACTGAAG (červeně označena adaptorová sekvence attB1r)

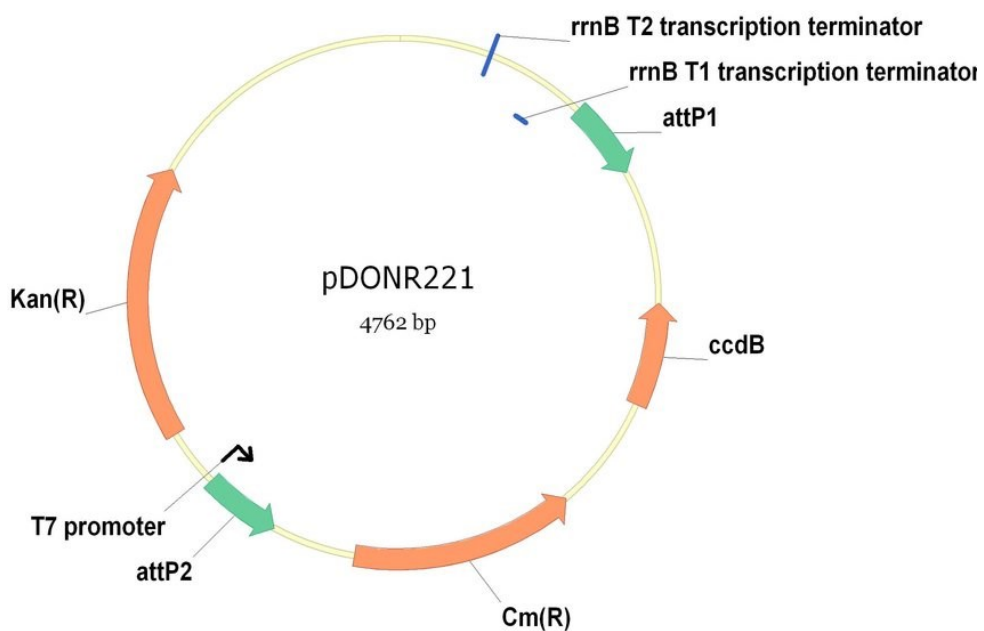
Transkripční fúze byla prováděna obdobně jako fúze translační. Promotorová sekvence *KUP5* byla vložena do vektoru pDONR221 P4P1r pomocí BP reakce. Získaný Entry Clone byl použit pro LR reakci s vektory pEN-L1-S-L2 nesoucím sekvenci genu pro GUS, pEN-R2-6-L3 nesoucím 35S terminátor a destinačním vektorem pB7m34GW nesoucím rezistenci pro herbicid BASTA. Tím byl získán Expression clone vektor pro transformaci rostlin.

Vektory

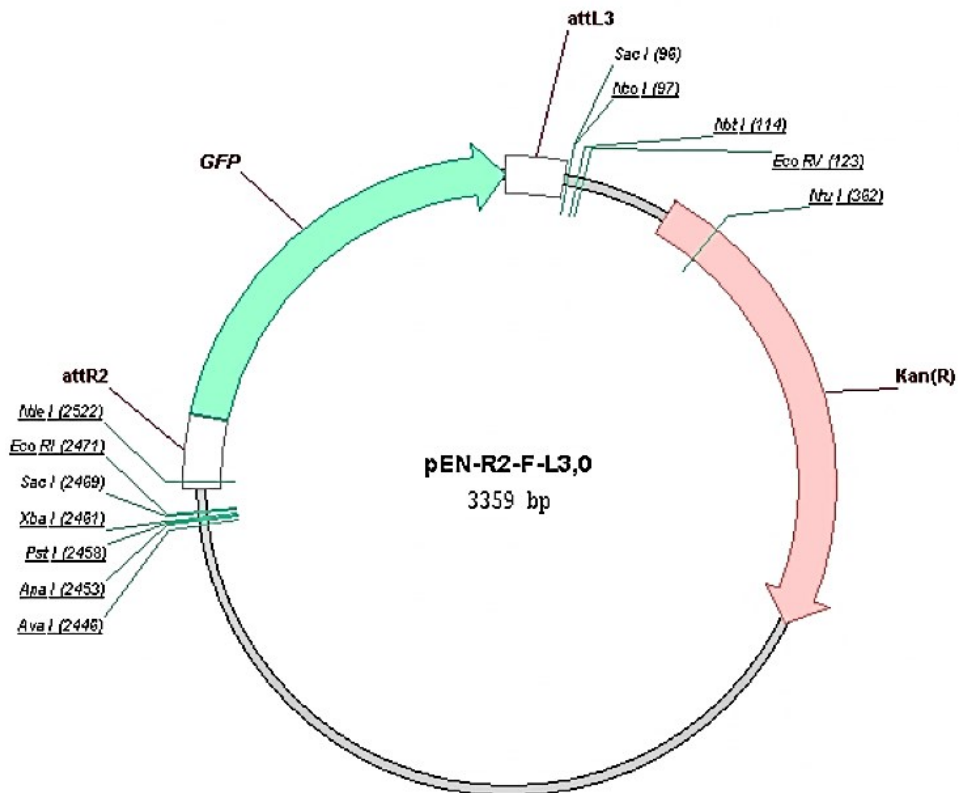
K vytvoření DNA konstruktů byly použity bakteriální plazmidové vektory (viz obrázek č. 10 – č. 15), které byly použity i pro vnesení DNA konstruktu do rostlin. Tyto plazmidy nesou geny pro rezistenci na různá antibiotika, díky kterým je možné selektovat bakterie i rostliny s vneseným konstruktem.



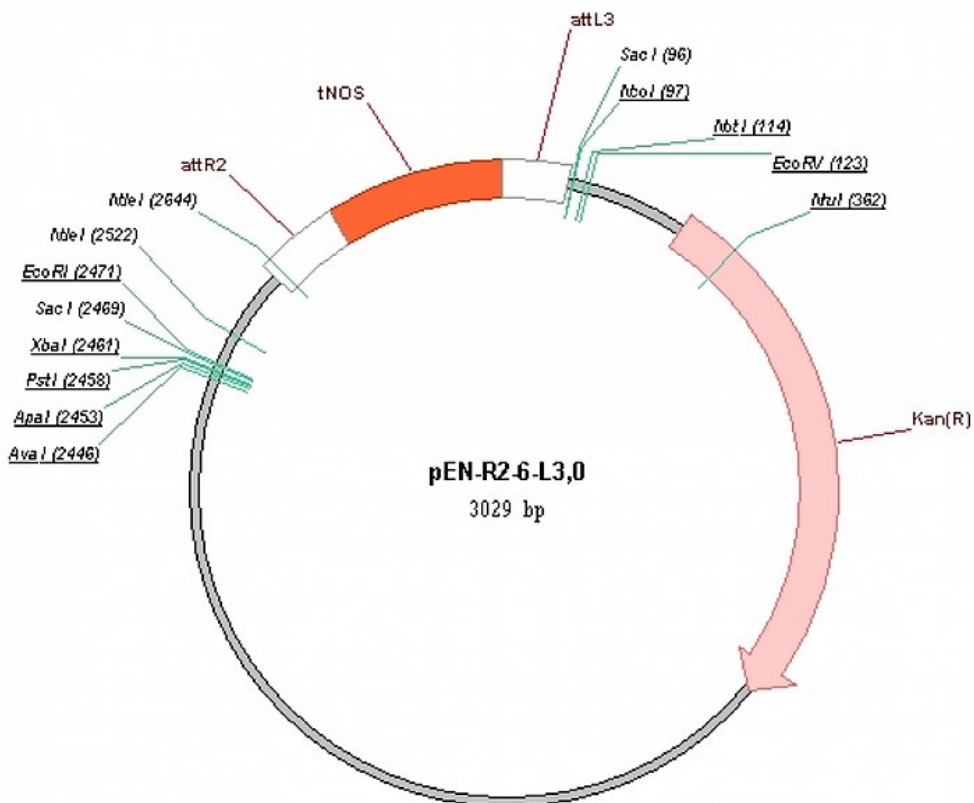
Obrázek č. 10 - Vektor pDONR P4P1r (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/multisite-gateway-technology.html>)



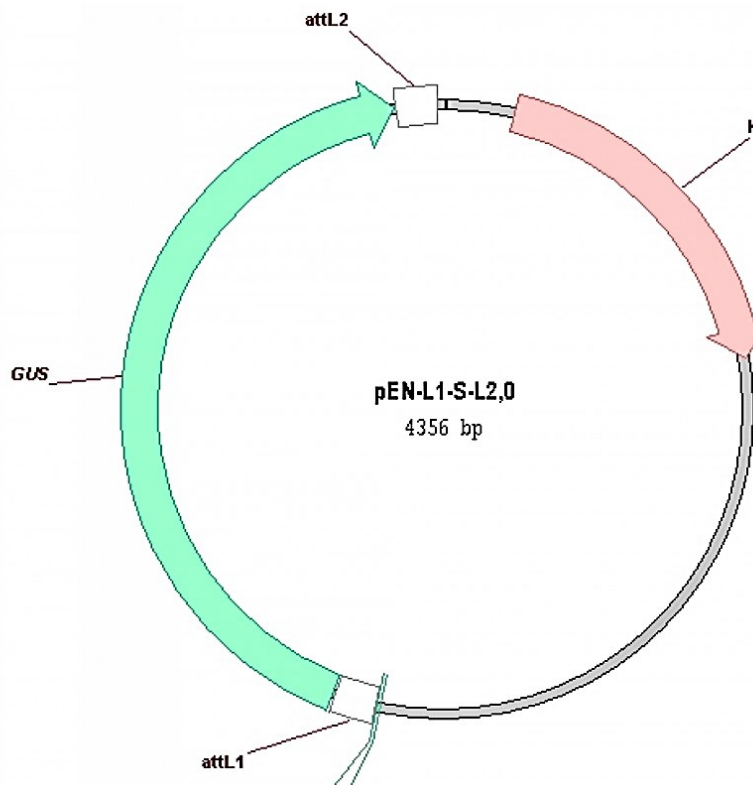
Obrázek č. 11 – Vektor pDONR221 (https://www.researchgate.net/figure/Figure-A4-Plasmid-map-of-pDONR221-Entry-vector-for-Gateway-cloning-Invitrogen_fig44_50812240)



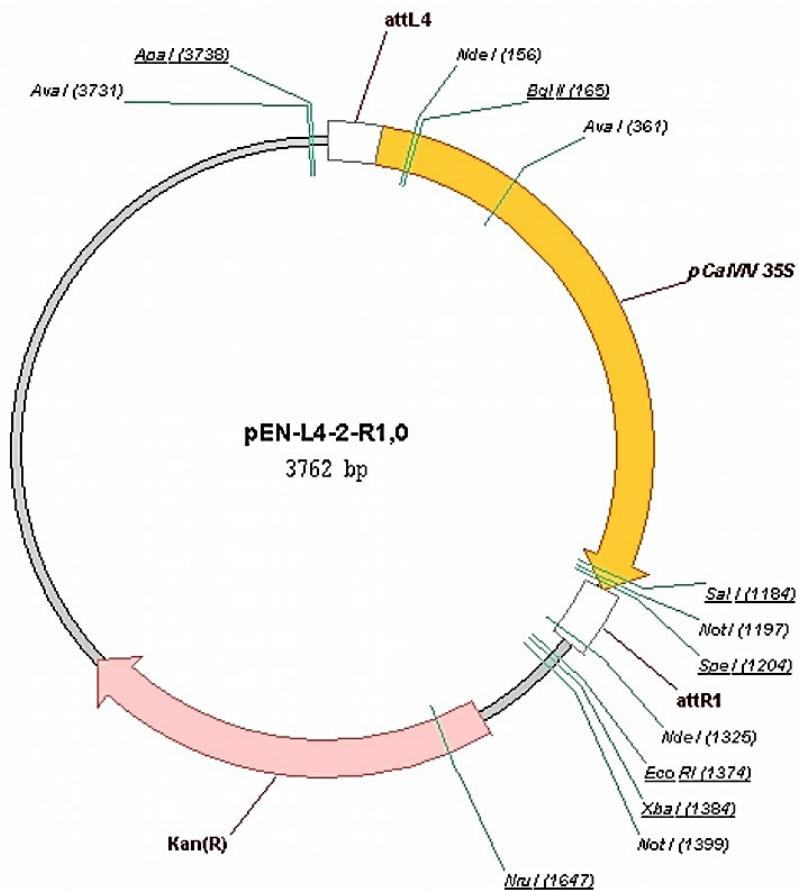
Obrázek č. 12 - Vektor pEN-R2-F-L3 (<https://gatewayvectors.vib.be/collection/pen-r2-f-l3>)



Obrázek č. 13 - Vektor pEN-R2-6-L3 (<https://gatewayvectors.vib.be/collection/pen-r2-6-l3>)



Obrázek č. 14 - Vektor pEN-L1-S-L2 (<https://gatewayvectors.vib.be/collection/pen-l1-s-l2>)



Obrázek č. 15 - Vektor pEN-L4-2-R1 (<https://gatewayvectors.vib.be/collection/pen-l4-2-r1>)

3.3.2 Postup přípravy konstruktů a transformace rostlin

Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla pro potřeby přípravy konstruktů izolována pomocí CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) dle modifikovaného protokolu Murray and Thompson 1980. Z přibližně sedmidenních rostlin byla odebírána malá část (cca 0,5 cm) listu, která byla zhomogenizována jako v kapitole 3.1. Ke zhomogenizované směsi bylo přidáno 0,5 ml 2x CTAB (viz tabulka č. 11) a následně byly vyjmuty kuličky. Vzorky byly inkubovány 15 min. při 65 °C a při 300 kmitech/min. Po vychladnutí byl ke vzorkům přidán 1 ml směsi chloroform:izoamylalkohol (24:1), poté byly vzorky promíchány. Následně byly vzorky odstředěny po dobu 5 minut při 14000 ot./min.

Cca 0,5 ml horní vodní fáze bylo odsáto pipetou a přeneseno do čisté zkumavky a přidán 1 ml 96% etanolu. Vzorky byly 2 minuty promíchávány. Dále byly 15 minut inkubovány při 4 °C odstředovány 5 minut při 14000 ot./min. Supernatant byl odstraněn a peleta DNA byla promyta 1 ml 70% etanolu a odstředována 10 minut při 14000 ot./min. Etanol byl odstraněn a zkumavky byly vysoušeny 2 minuty při 37 °C. Po vysušení bylo přidáno 36 µl sterilní destilované vody a 4 µl 10x koncentrovaného TE pufru. Peleta byla rozpouštěna 30 minut při 37 °C a 300 kmitech/min. Izolovaná DNA byla následně použita pro amplifikaci cílových sekvencí.

Tabulka č. 11 – Složení 2x CTAB	
Komponenta	Koncentrace
Tris HCl (pH = 8,0)	100 mM
CTAB	2 % (w/v)
EDTA	20mM
NaCl	1,4 M
PVP	2 % (w/v)
β merkaptoetanol	0,2 % (w/v)

Amplifikace

Jako první byla provedena amplifikace DNA pomocí PCR s použitím specifickým amplifikačních primerů (viz kap. 3.3.1). Amplifikované úseky DNA byly následně vneseny do jednotlivých vektorů. Pro amplifikaci DNA byla použita Q5 polymeráza (Q5® High-Fidelity DNA polymerase, NEB). Teploty pro nasedání primerů byly vypočítány dle jejich sekvence pomocí Tm Calculatoru (www.thermofischer.com). Složení použitého premixu pro amplifikace a jejich PCR program jsou uvedeny v tabulkách č. 12 a 13.

Správná velikost produktu (promotorová oblast *KUP5* o délce 2000 bp a jeho kódující sekvence o délce cca 3800 bp) byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy, viz kapitola 3.1.

Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku	Použité množství (μl)
Izolovaná DNA	-	1
Q5 polymeráza (Thermo Scientific)	5 U/ μl	0,25
dNTP	10 mM	0,4
Primer	20 μM	0,5
Primer	20 μM	0,5
Betain	5 M	4
Q5 reakční pufr	10x konc.	4
Destilovaná voda	-	9,35

Fáze cyklu	Teplota	Čas (min)
Iniciální denaturace	98 °C	0:30
Denaturace	98 °C	0:10
Nasedání primerů	specifická (dle Tm kalkulátoru)	0:30
Syntetická fáze	72 °C	3:00
Terminální syntetická fáze	72 °C	2:00
Ochlazení	4 °C	∞

} 34x

BP reakce

Pomocí BP reakce byla amplifikovaná DNA zaklonována do donorového vektoru Multisite Gateway systému, čímž vznikly Entry clone vektor. Konkrétní donorový vektor se lišil v závislosti na tom, zda se jednalo o translační nebo transkripční fúzi (viz kap. 3.3.1). V reakcích bylo použito 0,5 μl amplifikované DNA a 150 ng vektorové DNA. Enzymu BP klonázy (Gateway® BP Clonase® II enzyme mix – ThermoFischer Scientific) byl použit 1 μl. Dle koncentrace vzorků a vektorů byla směs pro BP reakci doplněna do 5 μl destilovanou vodou. BP reakce byla ponechána přes noc (15 hodin) při pokojové teplotě, po této době byl do reakce přidán 1 μl proteinázy K pro její ukončení a vzorek byl vložen na 15 minut do 37 °C.

Elektroporace

1 μl produktu BP reakce byl přidán k elektrokompetentním buňkám *E.coli* (DH5α) připravených dle protokolu (Miller and Nickoloff 1995) a směs byla ponechána 1 minutu na ledu. Poté byla přenesena do elektroporační kyvety a byl aplikován elektrický výboj při napětí 2500 V trvající zhruba 6 ms v elektroporátoru (Bio-Rad Gene Pulser Aparatur) a ihned poté

byl přidán 1 ml SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) média se složením uvedeném v tabulce č. 14.

Komponenta	Množství
Pepton	0,4 g
Kvasniční extrakt	0,1 g
Glukóza	0,0721 g
NaCl	0,0117 g
KCl	0,0037 g
MgCl ₂	0,019 g
MgSO ₄	0,0241 g
dH ₂ O	20 ml

Vzorek byl přelit do sterilní zkumavky. Vzorky ve zkumavkách byly hodinu kultivovány při 37° C za stálého třepání pro lepší okysličení vzorku. Po 1 hodině byl vzorek sterilně přenesen na Petriho misky s tuhým LB médiem, ve kterém bylo přidáno antibiotikum kanamycin v koncentraci 50 µg/ml. Bakterie na Petriho miskách byly inkubovány při 37 °C po dobu 16 hodin.

Colony PCR (kontrolní PCR kolonií)

Po nárůstu kolonií byly kolonie testovány, zda obsahují požadovaný vektor, pomocí Colony PCR. Pro ověření přítomnosti byly použity primery M13, které nasedají na vektor ve specifickém místě, viz tabulka č. 15. Pomocí sterilní špičky byla přenesena část dané kolonie sloužící jako templát pro amplifikaci pomocí uvedených primerů.

M13 primer fw	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 primer rv	CAGGAAACAGCTATGAC

Velikost PCR produktů byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy. Kolonie, které byly pozitivně testovány, byly inokulovány do 3 ml tekutého LB média pro namnožení bakterií. V tekutém LB médiu byl také přidán kanamycin (50 µg/ml) a celá zkumavka byla vložena na třepačku s teplotou 37 °C.

Po cca 15 hodinách kultivace byl připraven MiniPrep dle protokolu výrobce (ZR Plasmid MiniPrep Classic).

Ke stanovení koncentrace DNA ve vzorku byl používán přístroj NanoDrop (Thermo Scientific). Jako pozadí pro měření byl využit roztok, ve kterém byla DNA rozpuštěna. Pro měření bylo nanášeno 1,5 µl roztoku.

Správnost vzniklého konstruktů byla ověřena restrikcí Restrikční enzymy a vhodná místa štěpení byly navrženy v programu Geneious 8.1.9 *in silico*. Vhodné restrikční enzymy by měly štěpit vektor tak, by bylo možné odlišit délku fragmentů prázdného vektoru a vektoru s požadovanou sekvencí. Pro Entry clone vektor byla použita restrikce pomocí TaqI restriktázy. Pro sestavené Expression clone vektory byly navrženy pro variantu pod nativním promotorem enzymy PvuII a SacI a pod 35S promotorem enzymy PstI a NcoI. Kontrolní restrikce (složení směsi viz tabulka č. 16) byla ponechána přes noc při 37 °C. Pro vizualizaci výsledků byla provedena agarózová elektroforéza. Stejným způsobem byla provedena restrikce i po LR reakci.

Tabulka č. 16 – Složení směsi pro restrikční reakci (20 µl)	
Komponenta	Množství
DNA	2 µl
Reakční pufr dle použitého restrikčního enzymu	2 µl
Restrikční enzym	0,5 µl
dH ₂ O	Doplnit do 20 µl

Pozitivní vzorky byly následně sekvenovány (Biogen Praha – GATC). Vzorky byly připraveny dle návodu sekvenační laboratoře Genseq s.r.o. (<http://www.genseq.cz/>). Množství 5 µl templátu (koncentrace DNA 80 - 100 ng/µl) bylo smícháno s 5 µl primeru. Byly použity primery M13, které stačily na pročtení sekvence promotoru. Pro sekvenaci kódující oblasti genu (cca 5000 bp) byly navíc použity i primery nasedající do střední části této sekvence (viz tabulka č. 17)

Tabulka č. 17 – Specifické primery použité na pročtení kódující oblasti genu <i>KUP5</i>	
seq	GTATGTCCTGTTCCAAGTG
seq 1	CTTCTTCTGATTTTAGTTCTTG
seq 2	CTTACTTTTATCCTTCTGGT

LR reakce

Po ověření správnosti vložené sekvence v Entry clone vektoru se přistoupilo k LR reakci, kterou z Entry clone vektorů vznikají Expression clone vektory pro transformaci rostlin.

V translační fúzi *KUP5* pod nativním promotorem byl použit MiniPrep z reakce pro promotorovou oblast i MiniPrep z reakce pro kódující sekvenci, spolu s vektorem pEN-R2-F-L3 a pB7m34GW (viz kap. 3.3.1). K této směsi byla přidána LR klonáza (Gateway® LR Clonase® II enzyme, ThermoFischer Scientific). Jednotlivé vektory byly dávkovány do reakce v ekvimolárním poměru. Reakce byla ponechána přes noc při pokojové teplotě a ukončena cca po 15 hodinách přidáním proteinázy K.

V translační fúzi *KUP5* pod promotorem *35S* byl použit MiniPrep z reakce pro kódující sekvenci *KUP5* spolu s vektory pEN-L4-2-L1, pEN-R2-F-L3 a pB7m34GW (viz kap. 3.3.1). Transkripční fúze *KUP5* byla provedena pomocí MiniPrepu pro promotorovou oblast a vektorů pEN-L1-S-L2, pEN-R2-6-L3 a pB7m34GW (viz kap. 3.3.1). V obou případech bylo následně postupováno stejně jako u translační fúze *KUP5* pod nativním promotorem.

Elektroporace

Elektroporace po LR reakci probíhala stejně jako elektroporace po BP reakci až do chvíle přenášení bakterií na tuhé LB médium. LB médium po LR reakci mělo, na rozdíl od předchozího tuhého LB média, přidáno antibiotikum spectinomycin. Antibiotikum bylo přidáno v koncentraci 50 µg/l. Na tuhém LB médiu byly bakterie ponechány 15 hodin a poté byla provedena Colony PCR ke zjištění pozitivních kolonií. Stejně jako u předchozího postupu byly vytvořeny MiniPrepy, jejichž správnost byla opět ověřena pomocí restrikce a sekvenace.

Po ověření správnosti následovala elektroporace do *Agrobacterium tumefaciens* (2000 V). Po elektroporaci se do vzorku přidalo Yeb Recovery médium, viz tabulka č. 18. Vzorky byly ponechány na třepačce dvě hodiny a poté přeneseny na tuhé LB médium se třemi druhy antibiotik – spectinomycin (50 µg/l), rifampicin (10 µg/l) a gentamycin (10 µg/l). Na tuhém LB médiu byly bakterie ponechány po dobu 2 dní, při 28 °C. Poté byla provedena Colony PCR pro detekci požadované sekvence. Kolonie, u kterých byla detekována požadovaná sekvence, byly zaočkovány do 3 ml tekutého LB média s již zmíněnými antibiotiky. Kolonie byly kultivovány 2 dny při 28 °C. Následně z části vzorku byla připravena konzerva a část byla pro následnou transformaci rostlin zaočkována do 50 ml tekutého LB média s antibiotiky a kultivovány po dobu 36 hodin. Příprava bakteriálních konzerv spočívá ve smíchání pozitivních kolonií v tekutém LB s glycerolem a zmrazení na -80 °C.

Tabulka č. 18 – Složení Yeb Recovery média	
- pro vytvoření kompletního Yeb Recovery média se smíchá 100 ml roztoku Recovery soli (viz tabulka č. 19) s 900 ml této směsi	
Komponenta	Množství
Pepton	5 g
Sacharóza	2,5 g
MgSO ₄	1 g
Kvasničný extrakt	0,5 g
dH ₂ O	650 ml

Tabulka č. 19 – Složení roztoku Recovery soli	
Komponenta	Množství
NaCl	2,922 g
MgSO ₄	1,2324 g
MgCl ₂	1,0167 g
KCl	93,19 mg
dH ₂ O	50 ml

Vnesení vektoru do rostliny *Arabidopsis thaliana* metodou floral dip

Po nárůstu bakterií *Agrobacterium* v tekutém LB médiu byl vzorek centrifugován při 5000 ot./min. po dobu 20 minut. Sediment byl poté rozpuštěn v médiu obsahujícím 5% sacharózu a 0,005% Silwet, používaný jako smáčedlo.

Zmíněné médium bylo nalito do sáčku v Petriho misce, a několik sekund se máčela nadzemní část rostliny v tomto médiu. Rostliny používané pro transformace musí mít kvetoucí stvoly, ale nesmí mít již vytvořené šešule se semeny, případně musejí být odstraněny. Poté, co byly rostliny namočený do suspenze bakterií, byly uzavřeny v plastovém sáčku a ponechány přes noc ve tmě. Následující den byl sáček odstraněn a rostliny byly přeneseny do kultivační místnosti.

Pro tento experiment byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Col-0 a mutantní genotyp *rdr6*.

Selekce transformovaných rostlin

Semena z transformovaných rostlin byla sklizena a sterilizována plynným chlórem po dobu čtyř hodin. Semena byla poté vyseta na sterilní substrát a přenesena do kultivační místnosti. Když se u rostlin objevily první pravé listy, byl pro selekci použit herbicid BASTA. Tato aplikace byla provedena třikrát, vždy s odstupem několika dnů. Rostliny, které přežily i po třetí aplikaci, byly přesazeny a ponechány růst. Následně z nich byla sklizena semena a ta využita v dalších experimentech.

Přítomnost konstruktů *pKUP5::GUS* v rostlinách byla také ověřena pomocí specifických primerů viz tabulka č. 20.

Tabulka č. 20 – Primery pro detekci konstruktů <i>pKUP5::GUS</i> v rostlinách	
KUP5 prom fw	TCCTGTTTCCTTGGATCAGA
GUS rv	TCTGCCAGTTCGTTGTTC

3.3.3 Analýza transformovaných rostlin

Mikroskopie

Základní pozorování transformovaných rostlin byla prováděna pomocí binokulární lupy SZX7, která je vybavena filtrem GFP. Lokalizace proteinů translačních fúzí pod nativním i 35S promotorem byla pozorována mikroskopy Olympus BX51 (kamera Apogee Alta, filtr set Narrow-band EGFP (41020, Chroma) s excitací 470 – 490 nm a emisí 500 – 520 nm) a Nikon Exlipse i90 (kamera Andor Zyla, filtr set FITC/EGFP (41001, Chroma) s excitací 460 – 500 nm a emisí 510 – 560 nm). V obou případech byl pro pozorování GFP signálu použit. Pro některá mikroskopická pozorování byly rostliny plazmolyzovány 1M roztokem KNO₃.

Bližší pozorování byla prováděna v laboratoři konfokální a fluorescenční mikroskopie PřFUK na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 s argonovým laserem (rozsah emise u GFP 490 - 550 nm a u FM4-64 600 – 790 nm). Rostliny byly pro lokalizaci plazmatické membrány barveny po dobu 1 minuty barvivem FM4-64. Následně byly fotografie zpracovány pomocí softwaru LAS X. Pro některá pozorování byl použit vertikální fluorescenční mikroskop CSU-W1 (v laboratoři dr. Fendrycha) se softwarem VisiView 4.4.0.14 (Visitron Systems). V tomto případě byla snímaná emise u GFP 520 nm, u FM4-64 a RFP-HDEL 640 nm. Fotografie byly v tomto případě zpracovávány v programu Image-J. Pro pozorování byly použity také rostliny s fluorescenčně značeným endoplazmatickým retikulem (RFP-HDEL).

Růstová analýza 35S:KUP5::GFP rostlin

Růstová analýza overexprimujících rostlin byla prováděna stejně jako analýza inzerčních mutantů a byla pro ni využita i stejná média (viz kapitola 3.2, tabulka č. 7).

Detekce aktivity GUS

Rostliny s konstruktem pKUP::GUS byly předpěstovány na miskách s 0,2xMS médiem a ponechány růst do doby, než kořeny dosahovaly délky 3 – 4 cm. Rostliny byly přeneseny po jedné do jamek společně s 3 ml vychlazeného 90% acetonu. Byly fixovány po dobu 30 minut. Následně byly promyty vychlazeným promývacím pufrem (viz tabulka č. 21) 2x po dobu 15 minut. Rostliny byly odvzdušněny pomocí olejové vývěvy a poté byl odsát promývací pufr. Do jamek byl přidán 1 ml barvicího roztoku (viz tabulka č. 21) a rostliny v něm byly ponechány přes noc ve tmě při 37 °C.

Dále se barvicí roztok odsál a rostliny byly postupně převedeny do projasňovacího roztoku pro pozorování jako whole-mount preparáty (Soukup and Tylová 2019). Do každé jamky byly

přidány 2 ml 15% glycerolu s 2% DMSO (dimethylsulfoxid) a po 30 minutách nahrazeny 2 ml 30% glycerolu s 2% DMSO. Po dalších 30 minutách byly přidány 2 ml 50% glycerolu s 0,1% tritonem na 30 minut a v posledním kroku 2 ml 65% glycerolu s 2% DMSO, opět na 30 minut. Po těchto krocích se na podložní sklo nanoslo 30 μ l projasňovacího roztoku (připraveného smícháním 0,04g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 20 ml 65% glycerolu, 17 g NaI a 0,4 ml 2% DMSO), do kterého se vložila 1 rostlina a překryla krycím sklem.

Tabulka č. 21 – Roztoky pro barvení GUS		
Komponenta	Promývací pufr (50 ml)	Barvicí pufr (20 ml)
50 mM ferrokyanid	500 μ l	200 μ l
50 mM ferrikyanid	500 μ l	200 μ l
0,1 M NaPO_4 , pH = 7	49 ml	20 ml
20 mg/ml X-gluc	-	200 μ l

4 Výsledky

4.1 Ověření T-DNA inzerčních mutantů

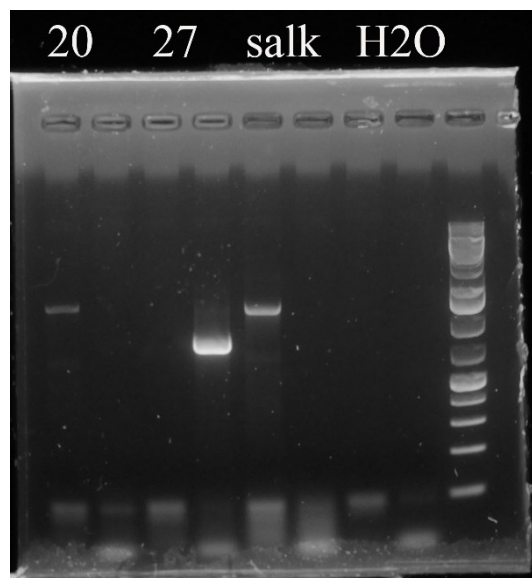
Jak již bylo zmíněno v metodice, křížení ověřených homozygotních rostlin *kup5* (linie SALK_120707) s divokým typem *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Col-8, NASC: N60000) provedl Mgr. Marek Šustr. Poté jsem z F2 generace selektovala divoký typ i homozygotně mutantní rostlinu s T-DNA inzercí. Selektce probíhala pomocí PCR genotypování (viz kapitola 3.1). Byly vyselektovány rostliny, které byly pozitivní pouze pro přirozenou alelu *KUP5* (divoký typ) a rostliny pozitivní pouze pro mutantní alelu (homozygotní mutant; viz obrázek č. 16). Do experimentálního uspořádání byla zahrnuta i reakce s H₂O namísto DNA templátu (negativní kontrola) a reakce s DNA templátem izolovaným z rostlin *Arabidopsis* Col 8 (NASC-N60000, genetické pozadí pro SALK linie), která představovala pozitivní kontrolu pro detekci wt

alely *KUP5* genu. Genotypování bylo provedeno vícekrát, aby nedošlo k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům. Semena z mutantní rostliny a rostliny divokého typu byla využívána dále v experimentech hodnotících růstový fenotyp rostlin.

4.2 Fenotypová analýza T-DNA inzerčních mutantů

U homozygotních T-DNA inzerčních mutantů *kup5* byl hodnocen celkový růst rostlin v porovnání s rostlinami divokého typu (wt) v různých experimentálních podmínkách. Oba genotypy byly selektovány z F2 generace po křížení *kup5* mutantní rostliny (SALK_120707) s rostlinou divokého typu (viz kap. 4.1).

Byla hodnocena produkce biomasy prýtu i kořenů a byl detailně hodnocen růst kořenového systému. Tato analýza byla prováděna u rostlin rostoucích v *in vitro* podmínkách na agarovém



Obrázek č. 16 – Potvrzení linie nesoucí inzerci v obou alelách genu *KUP5*. Zleva: 20 – wt (homozygotní rostlina divokého typu), 27 – homozygotně mutantní rostlina *kup5*, SALK – pozitivní kontrola pro detekci wt alely, H₂O – negativní kontrola, DNA žebříček (1 kb+). Pro každý vzorek je vlevo produkt PCR reakce při použití primerů detekujících wt alelu a vpravo produkt s primery detekujícími přítomnost T-DNA inzerce.

médiu v různých variantách. Rostliny byly pěstovány na kontrolním 0,2xMS médiu s 4 mM K^+ a na médiu s nízkým obsahem K^+ (30 $\mu M K^+$). Tyto dvě varianty byly dále upraveny a rostliny byly vystaveny stresovým faktorům sucha a zasolení. Zasolení bylo indukováno přidavkem 50 mM NaCl; sucho bylo indukováno zvýšením obsahu agaru v médiu z 1 % na 1,5 % (médiu je sušší a pevnější).

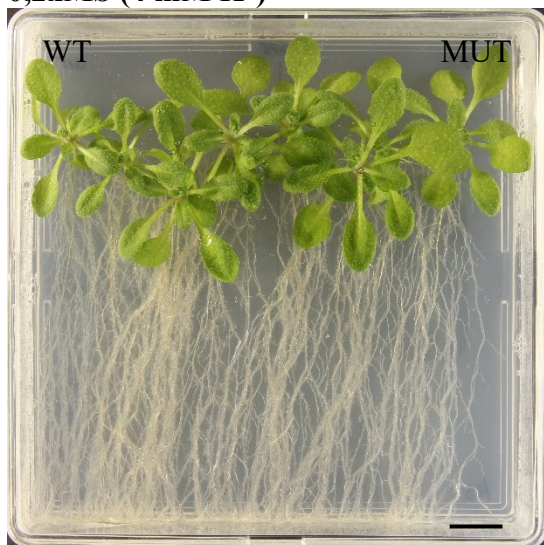
Rostliny byly předpěstovány na kontrolním médiu (0,2xMS) a poté přesazeny na jednotlivé varianty média. Detailní parametry růstu kořenového systému byly hodnoceny 5. den po přesazení, biomasy byly odebrány dva týdny po přesazení. Byly provedeny dva nezávislé experimenty.

4.2.1 Experiment 1

Produkce biomasy rostlin

Výsledky experimentu 1 ukazují, že varianty kultivace výrazně ovlivnily růst obou genotypů. Obecně lze říci, že rostliny vystavené snížené koncentraci K^+ (30 $\mu M K^+$) vykazovaly ve všech variantách kultivace zhoršený růst oproti identickému médiu s plnou dávkou draslíku (4 mM K^+). Tento trend platil pro kontrolní médium (0,2xMS) i pro média se stresovými variantami – s 50 mM NaCl a 1,5 % agarem (obr. 17 – 22). Samotný přídavek 50 mM NaCl nebo zvýšení koncentrace agaru v médiu z 1 % na 1,5 % ovlivnilo růst rostlin výrazně méně (obr. 17 – 22).

0,2xMS (4 mM K^+)



30 $\mu M K$



0,2xMS + 1,5 % agar



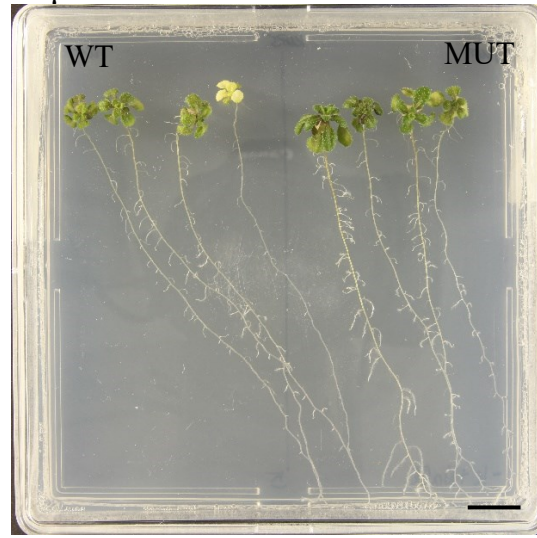
30 μM K + 1,5 % agar



0,2xMS + 50 mM NaCl



30 μM K + 50 mM NaCl



Obrázky č. 17–22 – Kultivační misky s rostlinami divokého typu (WT) a *kup5* mutantními rostlinami (MUT) dva týdny po přesazení do jednotlivých variant kultivace. Sloupec vlevo ukazuje varianty médií s 4 mM K⁺ (0,2xMS, 0,2xMS + 1,5 % agar, 0,2xMS + 50 mM NaCl), sloupec vpravo ukazuje varianty se sníženým obsahem K⁺ (30 μM K, 30 μM K + 1,5 % agar, 30 μM K + 50 mM NaCl). Každá miska má v levé části rostliny divokého typu a v pravé části rostliny mutantní. Měřítka 1cm.

Rostliny ve variantách s 30 μM K měly výrazně redukovanou suchou i čerstvou hmotnost prýtu a kořene, jejich listy měly žlutější barvu oproti kontrolním rostlinám. Vykazovaly typický projev nedostatku draslíku, kdy žloutnou okrajové části především starších listů (obr. 17 – 22).

Statistická analýza ukázala, že je zde vysoce signifikantní vliv varianty kultivace na všechny parametry popisující produkci biomasy rostlin (GLM ANOVA, $p < 0,001$) – čerstvou hmotnost prýtu i kořenů, suchou hmotnost prýtu i kořenů, R/S poměr i relativní obsah vody v biomase prýtu i kořenů. Všechny parametry byly signifikantně nižší ve variantách s nízkým

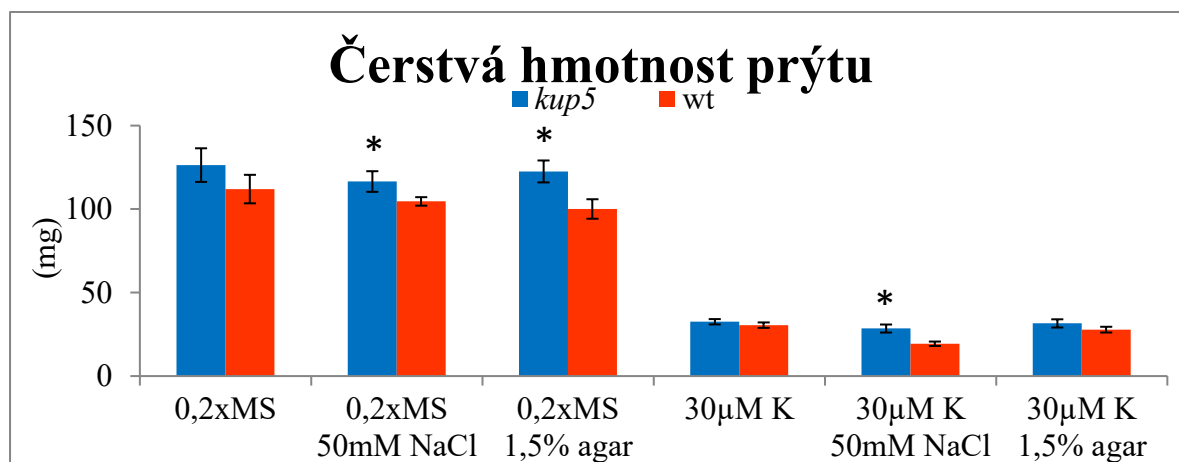
obsahem draslíku oproti variantám s plnou dávkou K⁺, ostatní varianty ovlivnily růst méně (graf 1-7).

V rámci variant s plným obsahem K⁺, byly rostliny ve variantě s 50 mM NaCl signifikantně menší oproti variantě bez NaCl ve většině sledovaných parametrů, kromě čerstvé hmotnosti prýtu (GLM ANOVA, p < 0,05). Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě varianty s 1,5% agarem, kde byly také signifikantní rozdíly naměřeny u většiny parametrů (GLM ANOVA, p < 0,05), s výjimkou čerstvé hmotnosti prýtu a suché hmotnosti prýtu. Lze tedy říci, že zvýšená salinita a vyšší obsah agaru v médiu inhibovaly především růst kořenového systému (graf č. 1-7).

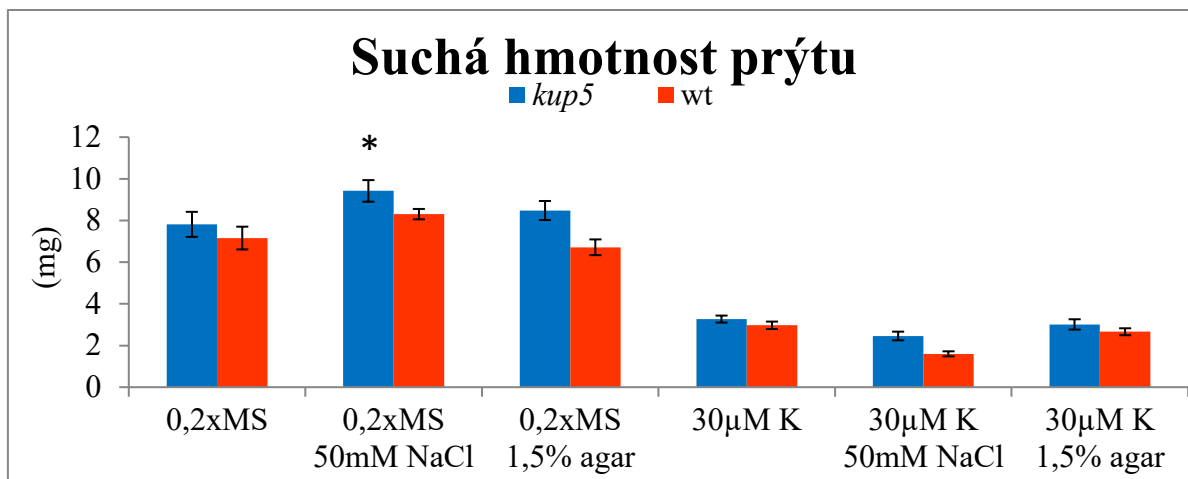
Na rozdíl od variant s plným obsahem K⁺, u variant s nízkým obsahem K⁺ nebyly signifikantní rozdíly mezi jednotlivými variantami téměř nikde zjištěny (graf č. 1-7). Pouze relativní obsah vody v kořenech byl signifikantně menší ve variantě s 50 mM NaCl a 1,5% agarem (GLM ANOVA, p < 0,05) a relativní obsah vody v prýtu byl nižší ve variantě s 50 mM NaCl (GLM ANOVA, p < 0,05).

Nejdůležitější částí experimentu bylo srovnání genotypů (*kup5* oproti rostlinám divokého typu). Analýza dat napříč všemi variantami kultivace ukázala, že signifikantní rozdíly mezi genotypy je možné pozorovat ve většině parametrů (GLM ANOVA, p < 0,05). Výjimku tvoří relativní obsah vody v prýtu i kořenech a R/S poměr, které se mezi genotypy neliší (GLM ANOVA p > 0,05; graf č. 1 – 7).

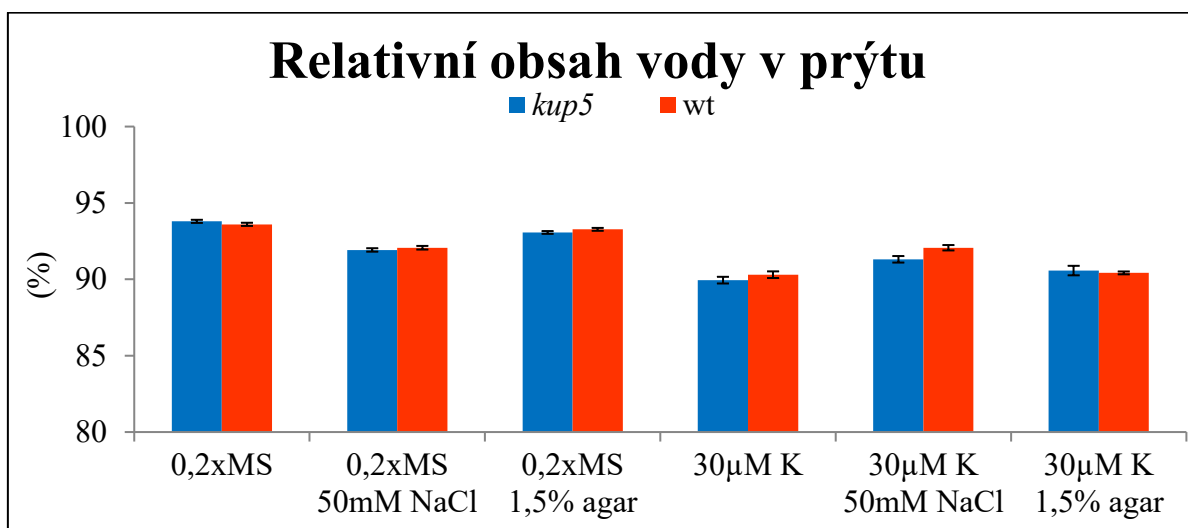
Detailní porovnání *kup5* mutantních rostlin a rostlin divokého typu v jednotlivých variantách kultivace pomocí T-testu ukázalo, že především ve variantě 0,2xMS + 50 mM NaCl, 0,2xMS + 1,5% agar a 30 μM K + 50 mM NaCl mají *kup5* rostliny signifikantně větší produkci biomasy než rostliny divokého typu (viz graf č. 1 – 7).



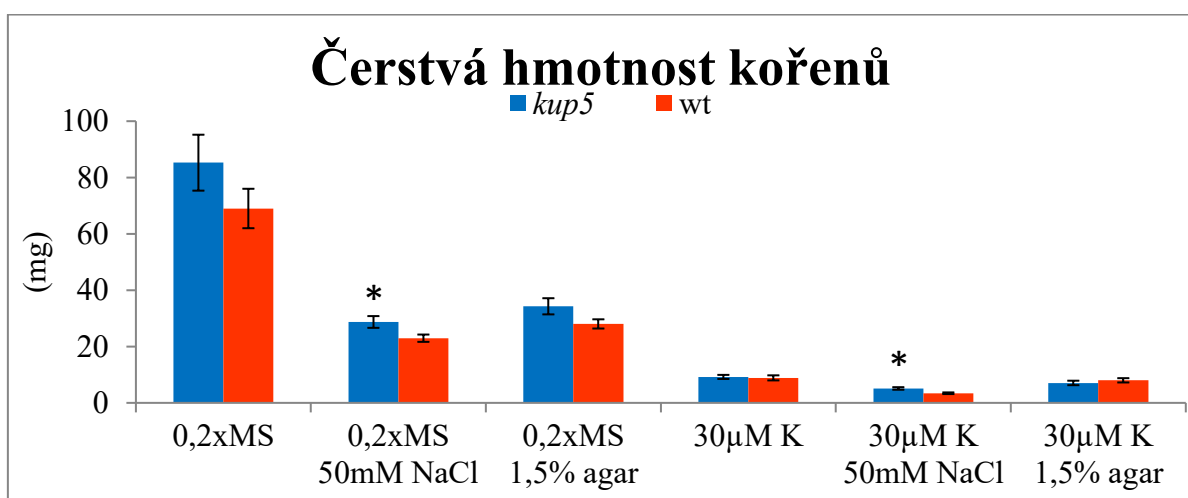
Graf č. 1 – Čerstvá hmotnost prýtu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostliny. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



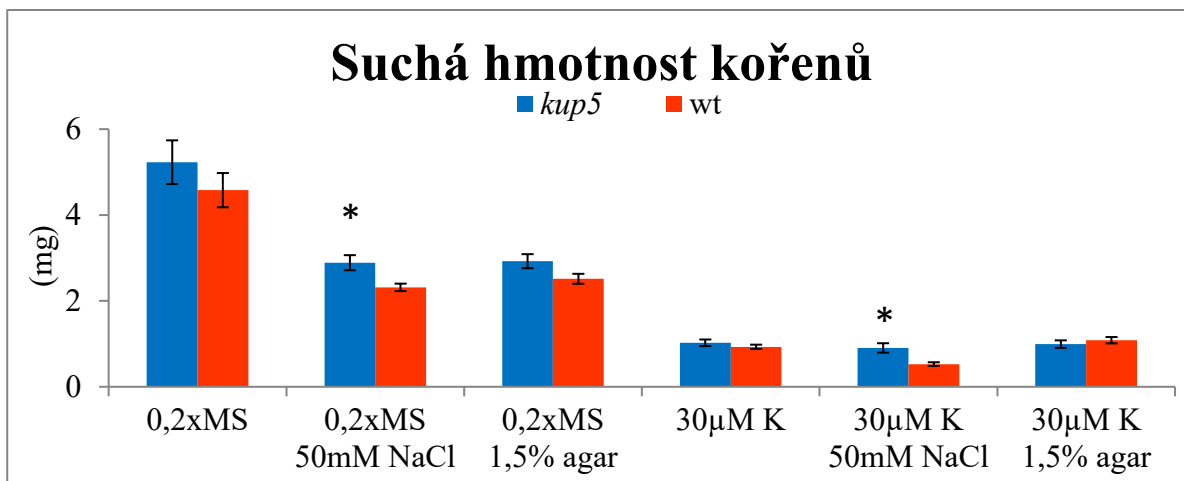
Graf č. 2 – Suchá hmotnost prýtu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostliny. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



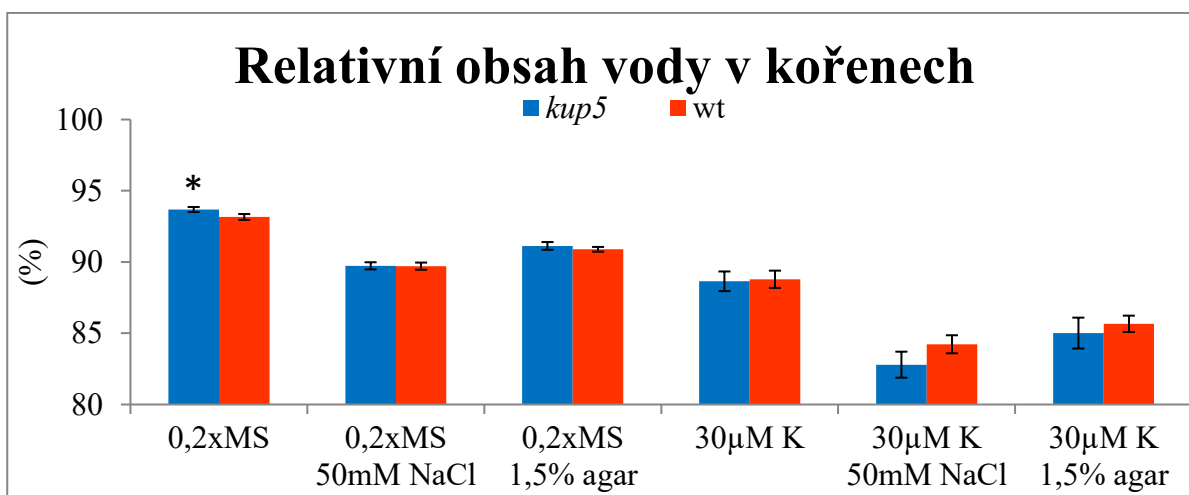
Graf č. 3 – Relativní obsah vody v prýtu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostliny. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA).



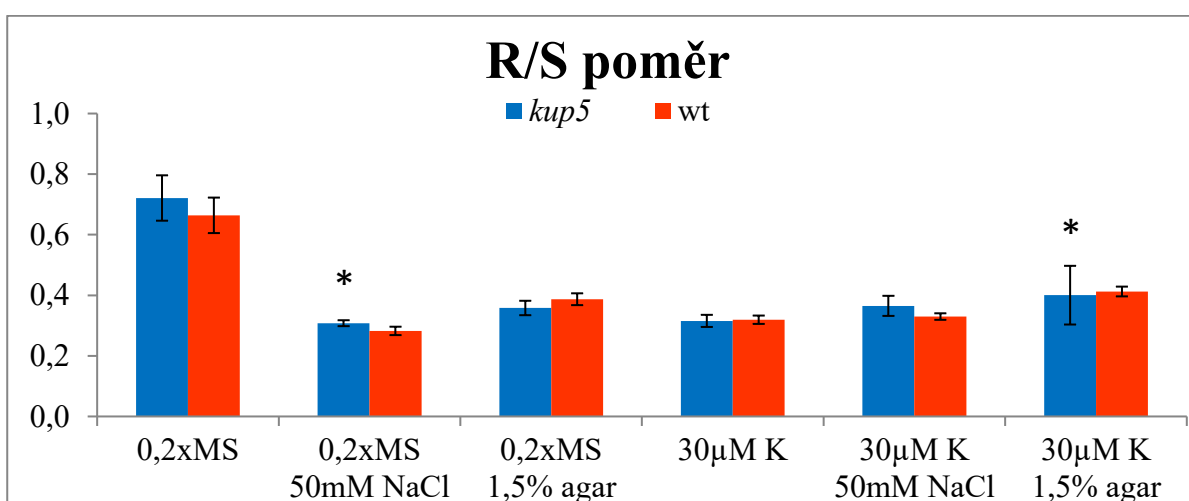
Graf č. 4 - Čerstvá hmotnost kořene (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostliny. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,05$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 5 – Suchá hmotnost prýtu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostliny. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,05$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 6 – Relativní obsah vody v kořeni (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostliny. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).

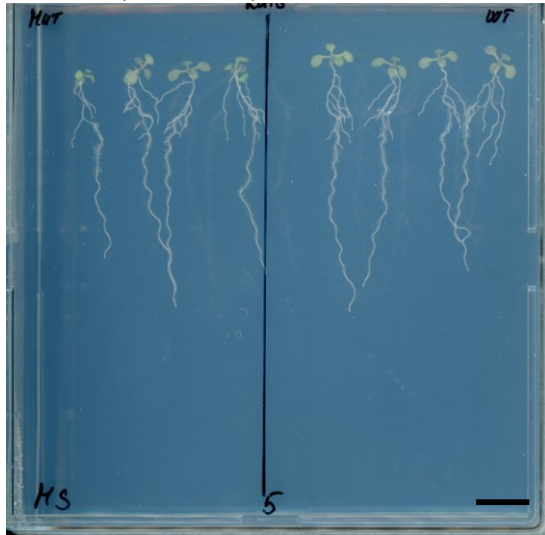


Graf č. 7 – Poměr biomasy kořenů k biomase prýtu (R/S poměr; průměr ± SE; n = 15-20). Wt - rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostliny. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).

Růst kořenového systému

Růst kořenového systému byl detailně analyzován 10. den kultivace (5. den po přesazení), kdy byly misky skenovány a rostliny ponechány růst pro následné sklizení biomasy. Na obrázcích č. 23 - 28 je ukázka kořenového systému rostlin 5. den po přesazení.

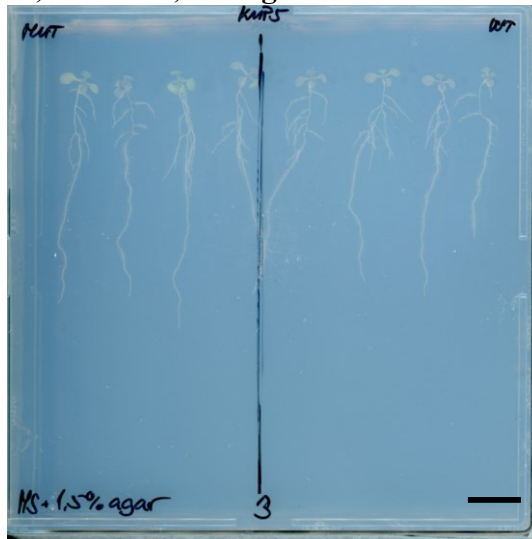
0,2xMS (4 mM K⁺)



30 μM K

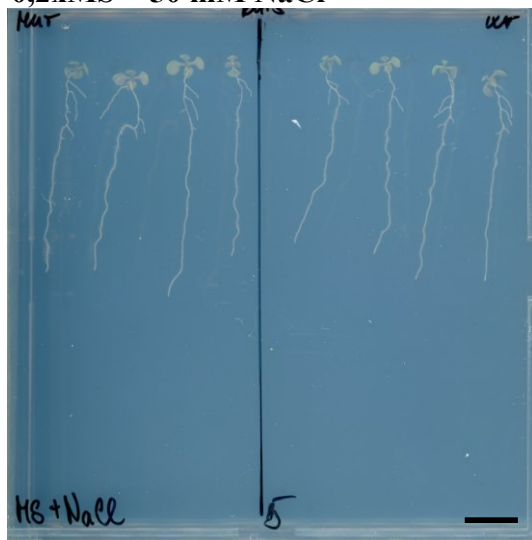
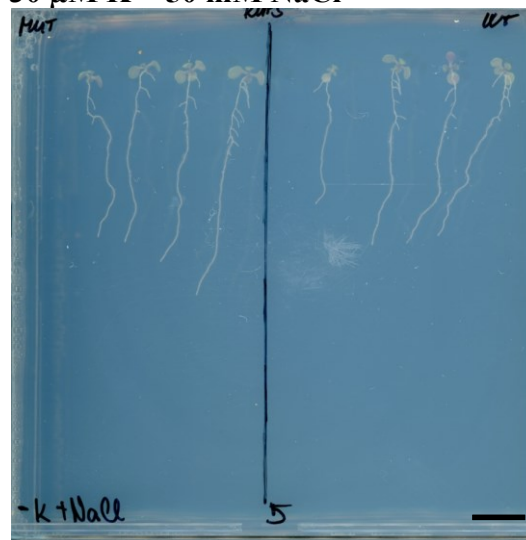


0,2xMS + 1,5 % agar



30 μM K + 1,5 % agar



0,2xMS + 50 mM NaCl**30 μ M K + 50 mM NaCl**

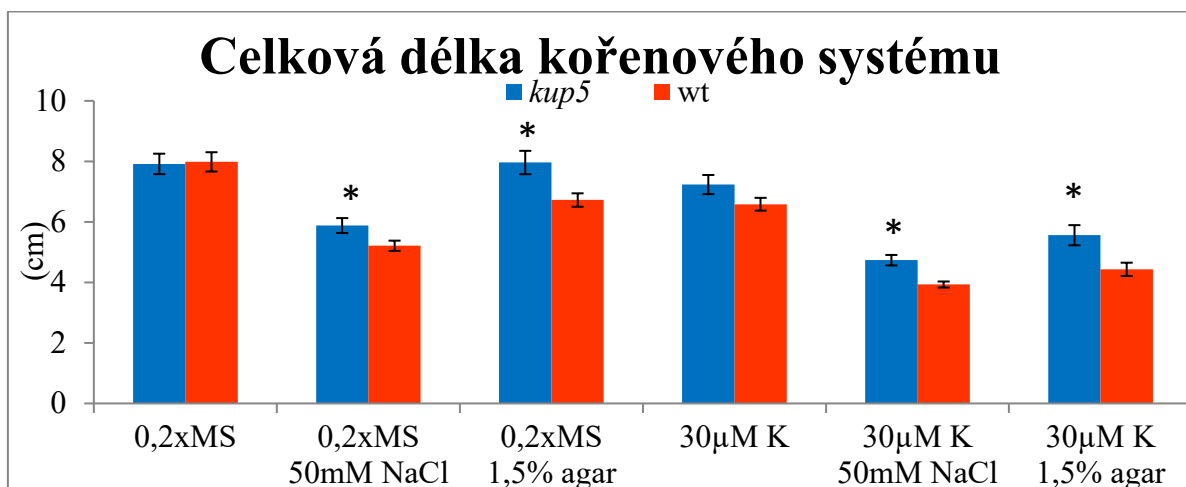
Obrázky č. 23 - 28 – Kultivační misky s rostlinami divokého typu (WT) a *kup5* mutantními rostlinami (MUT) 5 dní po přesazení do jednotlivých variant kultivace. Sloupec vlevo ukazuje varianty médií s 4 mM K^+ (0,2xMS, 0,2xMS + 1,5 % agar, 0,2xMS + 50 mM NaCl), sloupec vpravo ukazuje varianty se sníženým obsahem K^+ (30 μ M K, 30 μ M K + 1,5 % agar, 30 μ M K + 50 mM NaCl). Každá miska má v levé části rostliny mutantní a v pravé části rostliny divokého typu. Měřítka 1cm.

Výsledky měření délek kořenů ukázaly signifikantní rozdíly mezi variantami kultivace pro všechny měřené parametry kořenového systému – celkovou délku, délku hlavní osy kořene, celkovou délku postranních kořenů i jejich počty (GLM ANOVA, $p < 0,001$; graf č. 8 – 12). Celková délka kořenového systému byla nižší především ve variantách vystavených solnému stresu (GLM ANOVA, $p < 0,001$; graf č. 8), na čemž se podílela především výrazně menší délka postranních kořenů, ale i jejich menší počet a kratší hlavní osa kořene (GLM ANOVA, $p < 0,001$; graf č. 9 - 12).

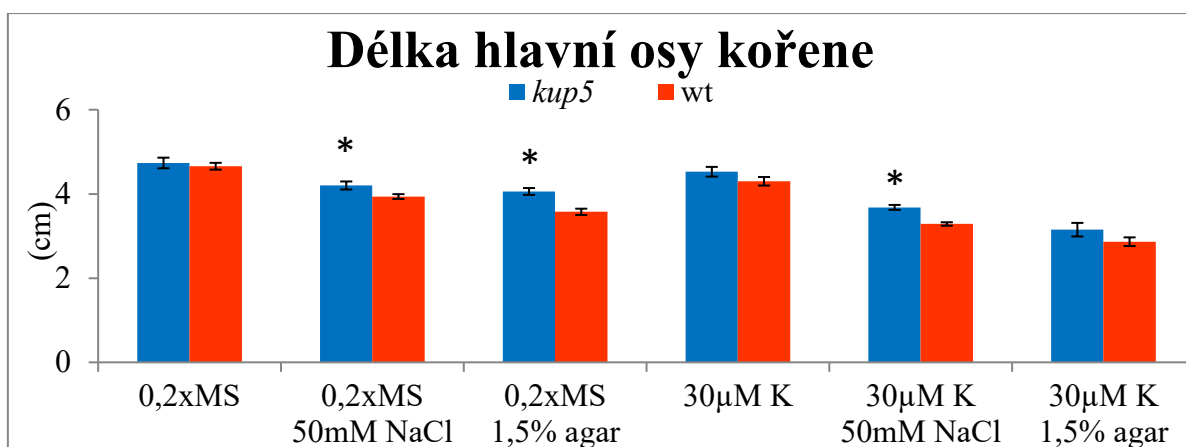
Naopak vliv nízkého obsahu K^+ na většinu parametrů kořenového systému nebyl signifikantní (GLM ANOVA, $p > 0,05$), na rozdíl od celkové produkce biomasy (viz výše). Důvodem je zřejmě kratší doba vystavení deficienci (pouze 5 dní), která se proto nestihla tolik projevit. Biomasy byly analyzovány až dva týdny po přesazení a v tu dobu již byl zhoršený růst postranních kořenů při nedostatku K^+ jasně patrný, ale nebylo možno jej detailně měřit (obrázek č. 16 – 21).

Signifikantně vychází také rozdíly mezi genotypy ve všech těchto parametrech (GLM ANOVA, $p < 0,05$). V souladu s výsledky produkce biomasy mají *kup5* mutantní rostliny delší kořenový systém (viz graf č. 8 – 12). Detailní statistické srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace (T-test) pak ukazuje signifikantní rozdíly především ve variantách, kde byl indukován stres salinity nebo sucha, tj. ve variantě 0,2xMS + 50 mM NaCl, 0,2xMS + 1,5% agar, 30 μ M K + 50 mM NaCl a 30 μ M K+1,5% agar (graf č. 8 – 12).

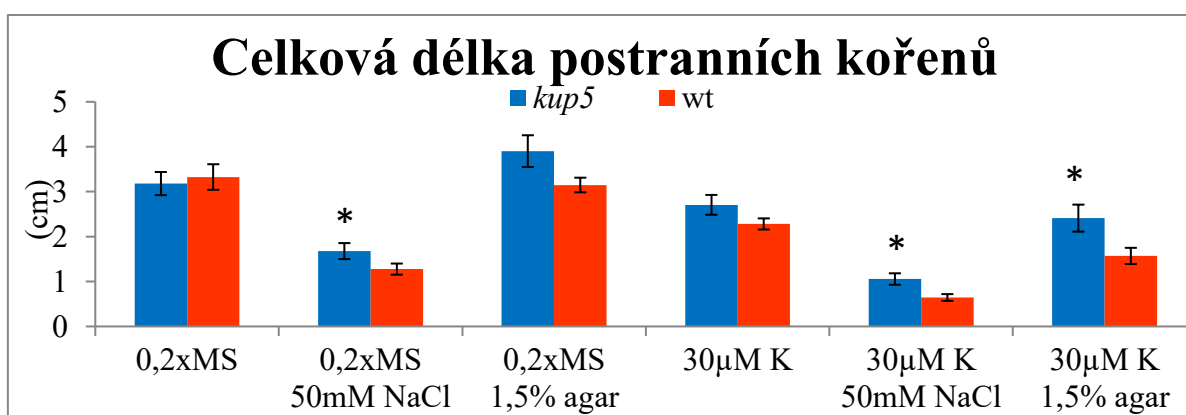
Naopak v kontrolní variantě (0,2xMS) se genotypy neliší v žádném parametru kořenového systému.



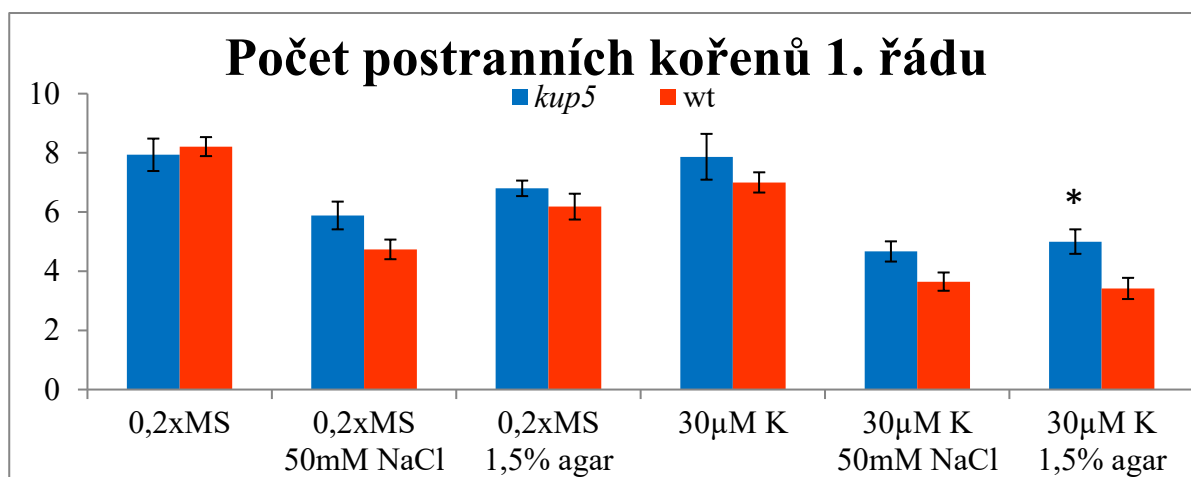
Graf č. 8 – Celková délka kořenového systému (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



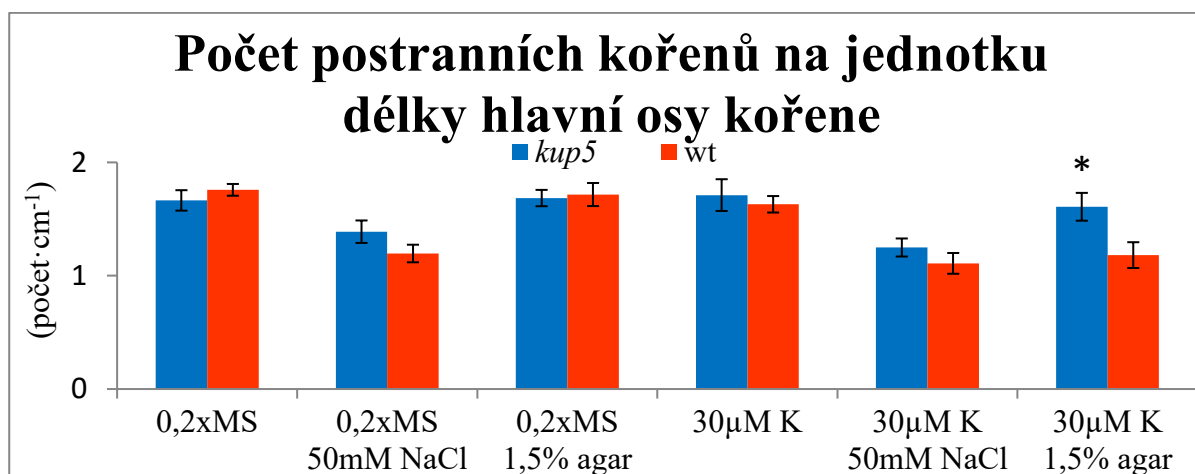
Graf č. 9 – Délka hlavní osy kořene (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 10 – Celková délka postranních kořenů (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,05$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 11 – Počet postranních kořenů 1. řádu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 12 – Počet postranních kořenů na jednotku délky hlavní osy kořene (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).

Shrnutí výsledků experimentu 1:

1. Varianty kultivace výrazně ovlivnily růst obou genotypů. Rostliny rostoucí na K⁺ deficientním médiu měly zhoršený růst proti rostlinám rostoucím na médiu s plnou dávkou K⁺ (pro všechny varianty médií). Rostliny vykazovaly typické projevy nedostatku K⁺. Statistická analýza ukázala signifikantní vliv nízkého obsahu K⁺ na celkovou produkci biomasy, naopak vliv nízkého obsahu K⁺ na parametry kořenového systému signifikantní nebyl. Důvodem může být kratší doba, po kterou byly rostliny vystaveny deficienci.
2. Zvýšená salinita a vyšší obsah agaru v médiu inhibovaly především růst kořenového systému. To potvrzují signifikantní rozdíly ve většině měření produkce biomasy mezi variantami bez NaCl a s 50 mM NaCl, podobně tomu tak bylo i u variant s vyšším

obsahem agaru. Tento trend byl patrný především u variant s plnou dávkou K^+ , u variant se sníženým obsahem K^+ nebyly tyto rozdíly téměř nikde zaznamenány.

3. Genotypy se mezi sebou v růstu signifikantně lišily. *Kup5* mutantní rostliny měly zvýšenou produkci biomasy i délku kořenového systému, a to především ve variantách se zvýšenou salinitou a na médiu s vyšším obsahem agaru.

4.2.2 Experiment 2

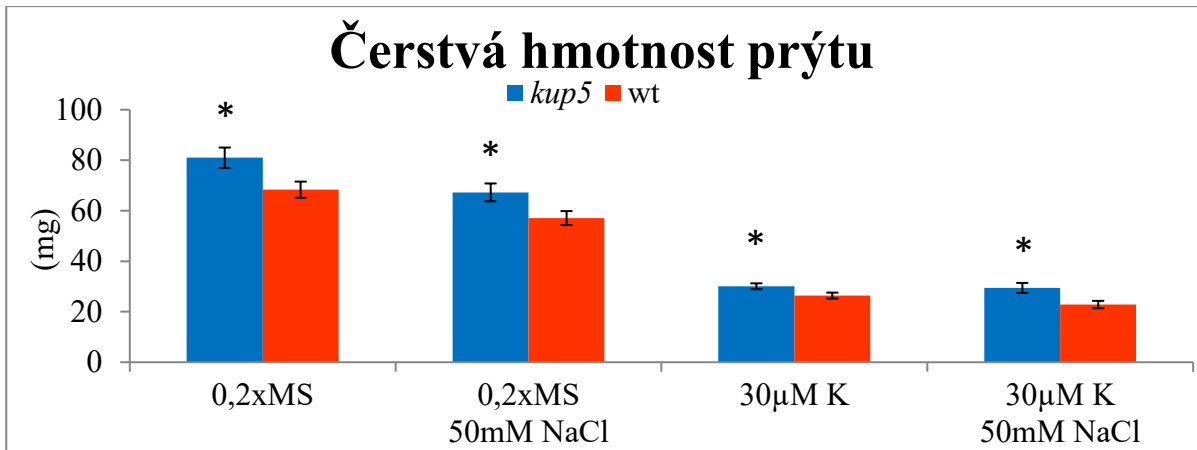
Experiment 2 byl proveden pro ověření výsledků experimentu 1. Proběhl ve stejném uspořádání, ale nebyly zařazeny varianty s vyšším obsahem agaru. I v této kultivaci byla hodnocena produkce biomasy (dva týdny po přesazení do variant) a růst kořenového systému (5. den po přesazení) u *kup5* mutantních rostlin a rostlin divokého typu.

Produkce biomasy rostlin

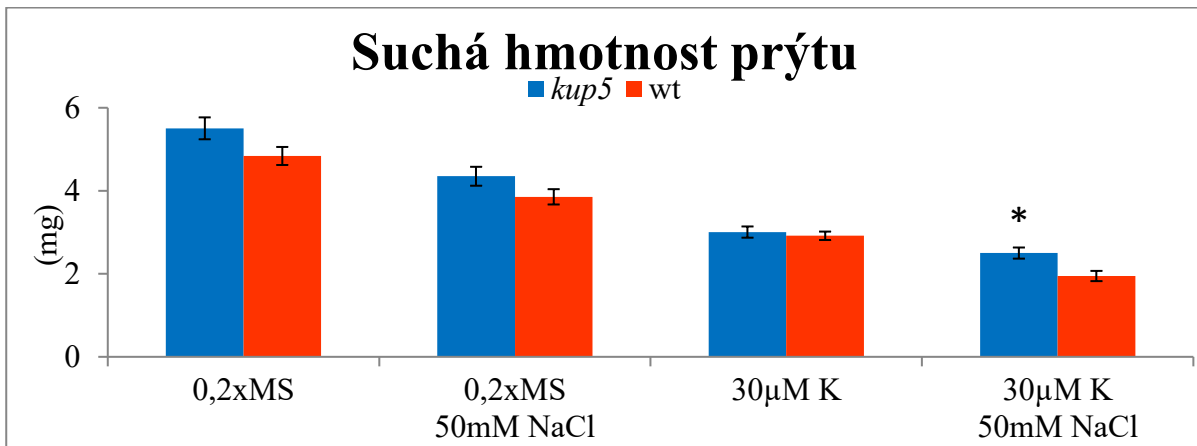
Stejně jako v experimentu 1 měly rostliny ve variantách s 30 μM K výrazně redukovanou suchou i čerstvou hmotnost prýtu a kořene. Také vykazovaly typický projev nedostatku draslíku. Statistická analýza ukázala signifikantní vliv varianty kultivace na všechny parametry popisující produkci biomasy rostlin (GLM ANOVA, $p < 0,001$). Všechny parametry byly signifikantně nižší ve variantách s nízkým obsahem draslíku (graf č. 13 – 19). Rozdíl mezi kontrolní variantou bez NaCl a s 50 mM NaCl (GLM ANOVA, $p < 0,001$) byl signifikantní ve většině parametrů (kromě relativních obsahů vody v prýtu a kořeni). Rostliny na médiu s 50 mM NaCl byly celkově menší. Ve variantách s nízkým obsahem K^+ se většina parametrů nelišila, opět byl zaznamenán pouze signifikantně menší obsah vody v kořenech (graf č. 18) a suché hmotnosti prýtu (graf č. 14) ve variantě s 50 mM NaCl (GLM ANOVA, $p < 0,001$). Relativní obsah vody v prýtu byl naopak vyšší, což je jediný trend, který nebyl pozorován v experimentu 1. Celkově lze říci, že experiment 2 potvrdil výsledky experimentu 1 ve většině měřených parametrů biomasy rostlin.

Také ve srovnání genotypů (*kup5* vůči rostlinám divokého typu) experiment 2 potvrdil výsledky experimentu 1. *Kup5* mutantní rostliny byly celkově větší, signifikantní rozdíly byly nalezeny ve většině parametrů (GLM ANOVA, $p < 0,05$; graf č. 13 – 19). Jediným rozdílem oproti experimentu 1 byl relativní obsah vody v prýtu, který byl signifikantně vyšší u *kup5* oproti rostlinám divokého typu (GLM ANOVA, $p < 0,05$; viz graf č. 15), což nebylo v experimentu 1 pozorováno.

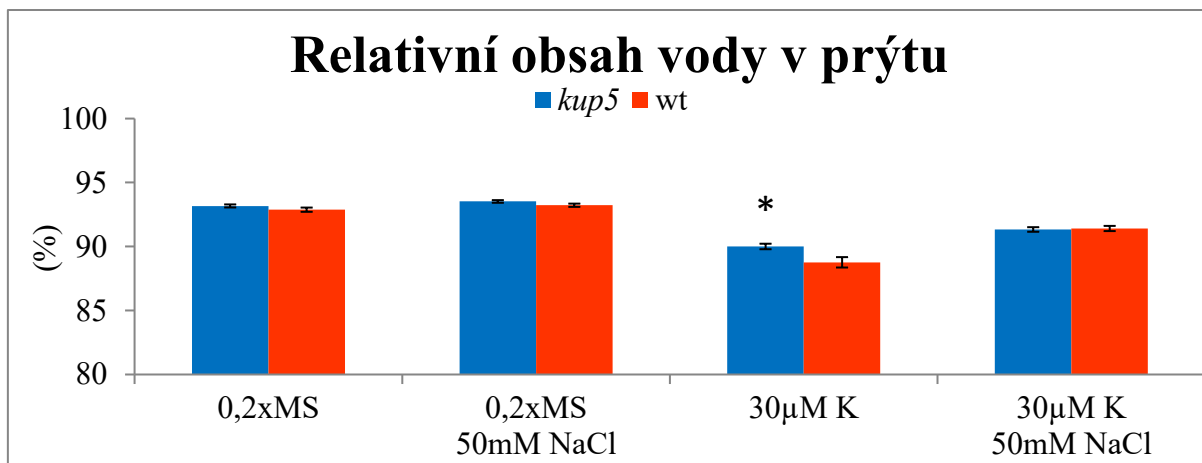
Detailní porovnání *kup5* mutantních rostlin a rostlin divokého typu v jednotlivých variantách kultivace pomocí T-testu ukázalo, že především ve variantě 0,2xMS + 50 mM NaCl, 30 μ M K a 30 μ M K + 50 mM NaCl mají *kup5* rostliny signifikantně větší produkci biomasy oproti rostlinám divokého typu (viz graf č. 13 – 19), což opět potvrzuje výsledky prvního experimentu.



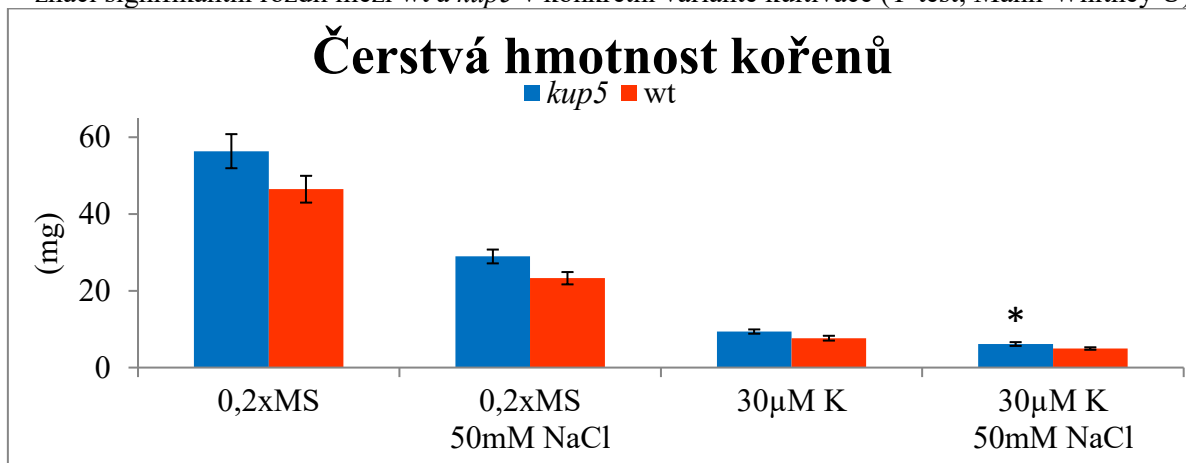
Graf č. 13 – Čerstvá hmotnost prýtu (průměr \pm SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



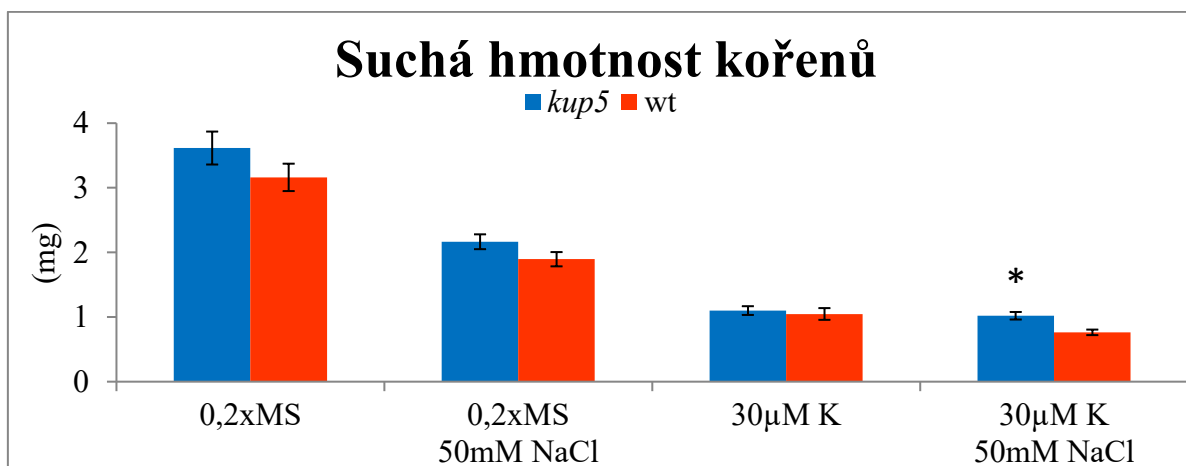
Graf č. 14 – Suchá hmotnost prýtu (průměr \pm SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



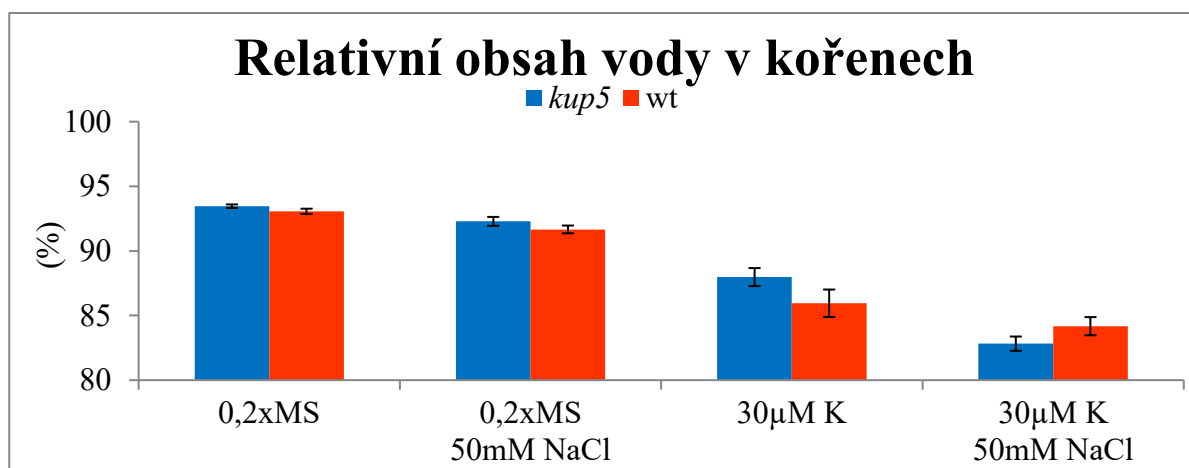
Graf č. 15 – Relativní obsah vody v prýtu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



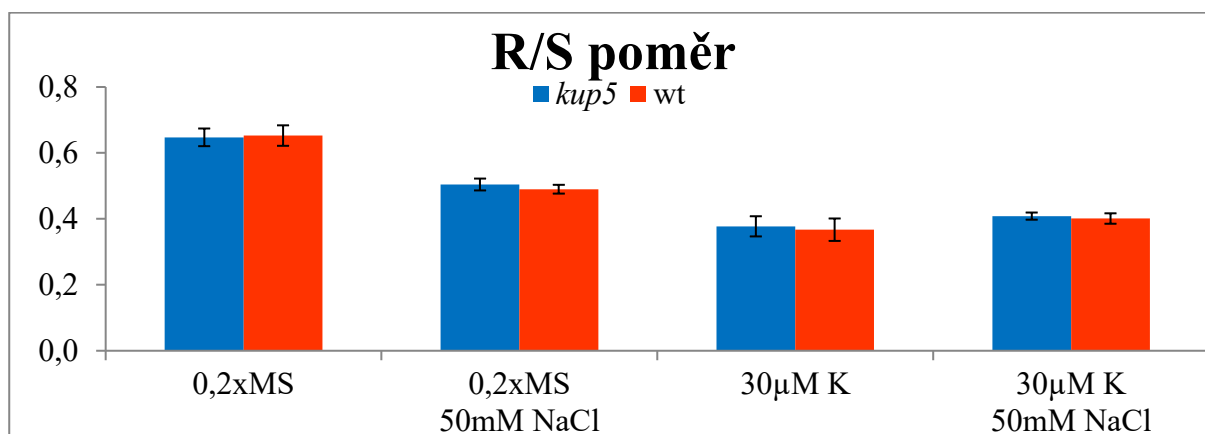
Graf č. 16 – Čerstvá hmotnost kořenů (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 17 – Suchá hmotnost prýtu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 18 – Relativní obsah vody v kořenech (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA).



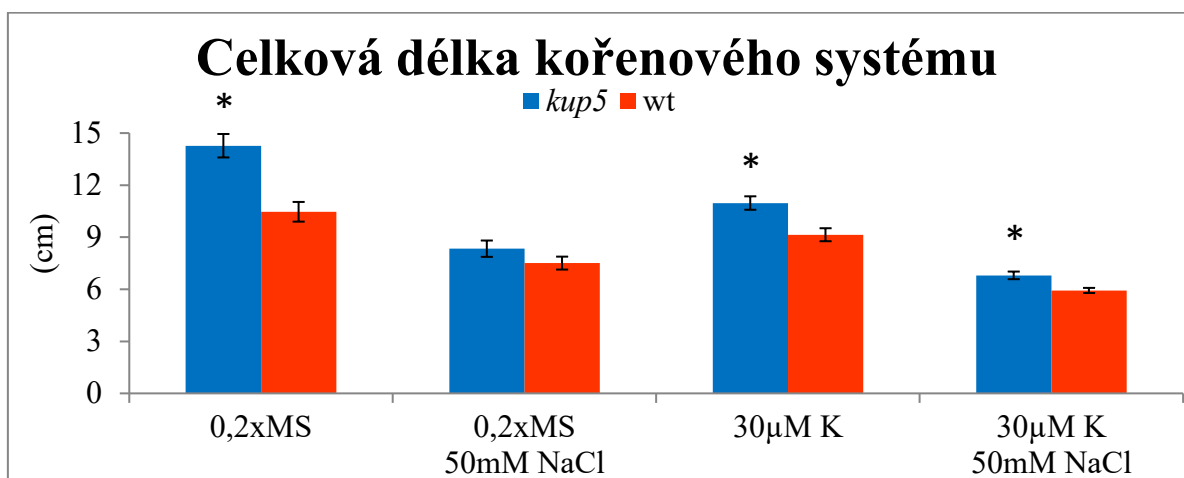
Graf č. 19 – Poměr biomasy kořenů k biomase prýtu (R/S poměr) (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).

Růst kořenového systému

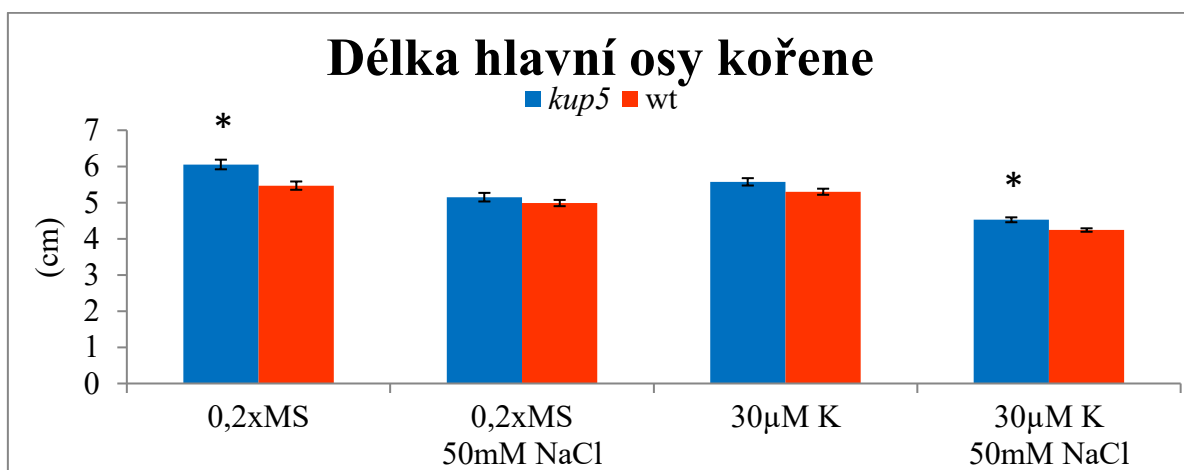
Výsledky měření kořenového systému potvrzují výsledky naměřené v experimentu 1. Mezi variantami kultivace byly zjištěny signifikantní rozdíly pro všechny měřené parametry (GLM ANOVA, $p < 0,001$; graf č. 20 – 24). Stejně jako v experimentu 1 byla snížena celková délka kořenového systému u rostlin vystavených solnému stresu (graf č. 20). Důvodem byly výrazně kratší postranní kořeny (graf č. 22), ale i jejich menší počet (graf č. 23) a délka hlavní osy kořene (graf č. 21). Na rozdíl od experimentu 1 bylo navíc detekováno signifikantní snížení délky hlavní osy kořene ve variantách s nízkým obsahem draslíku (GLM ANOVA, $p < 0,05$; graf č. 21). V experimentu 2 se tedy deficience K^+ projevila výrazněji již u mladších rostlin.

Signifikantní rozdíly mezi genotypy ve všech měřených parametrech potvrzují také výsledky z experimentu 1 (GLM ANOVA, $p < 0,05$). Mutantní rostliny *kup5* mají delší kořenový

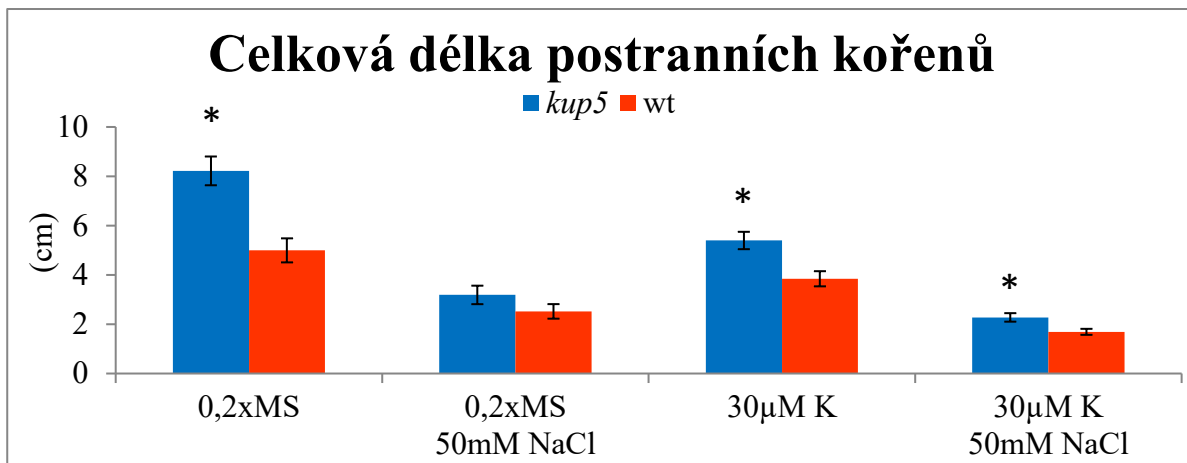
system (viz graf č. 20 – 24), což potvrzují i naměřené výsledky z produkce biomasy. Detailní srovnání genotypů v jednotlivých variantách kultivace ukazuje signifikantní rozdíly především ve variantách 0,2xMS a 30 μM K + 50 mM NaCl (graf č. 20 – 24).



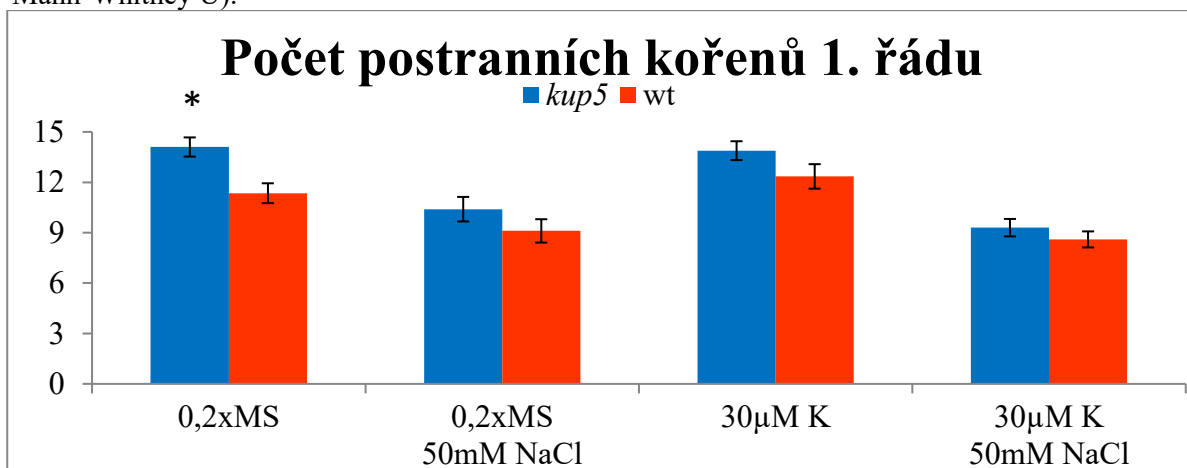
Graf č. 20 – Celková délka kořenového systému (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



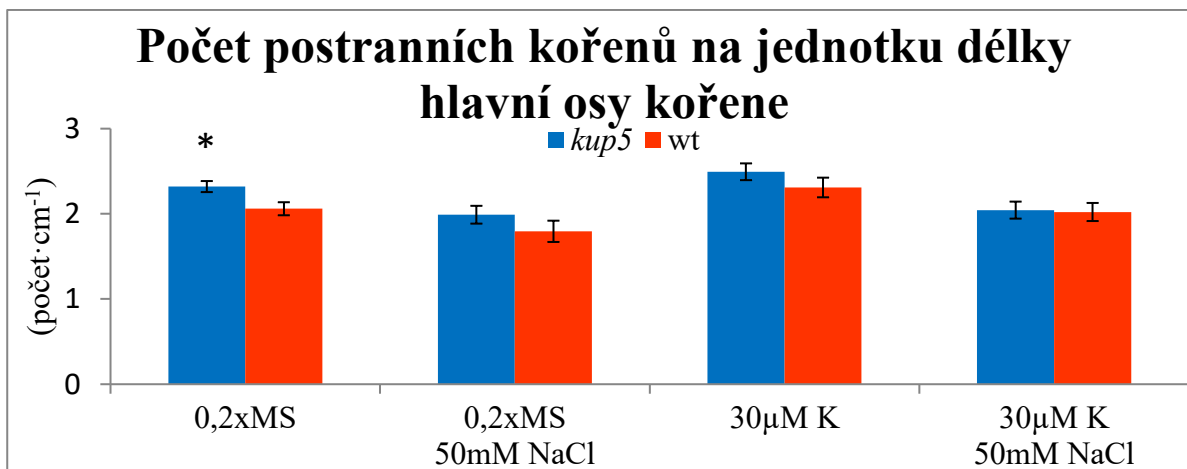
Graf č. 21 – Délka hlavní osy kořene (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 22 – Celková délka postranních kořenů (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



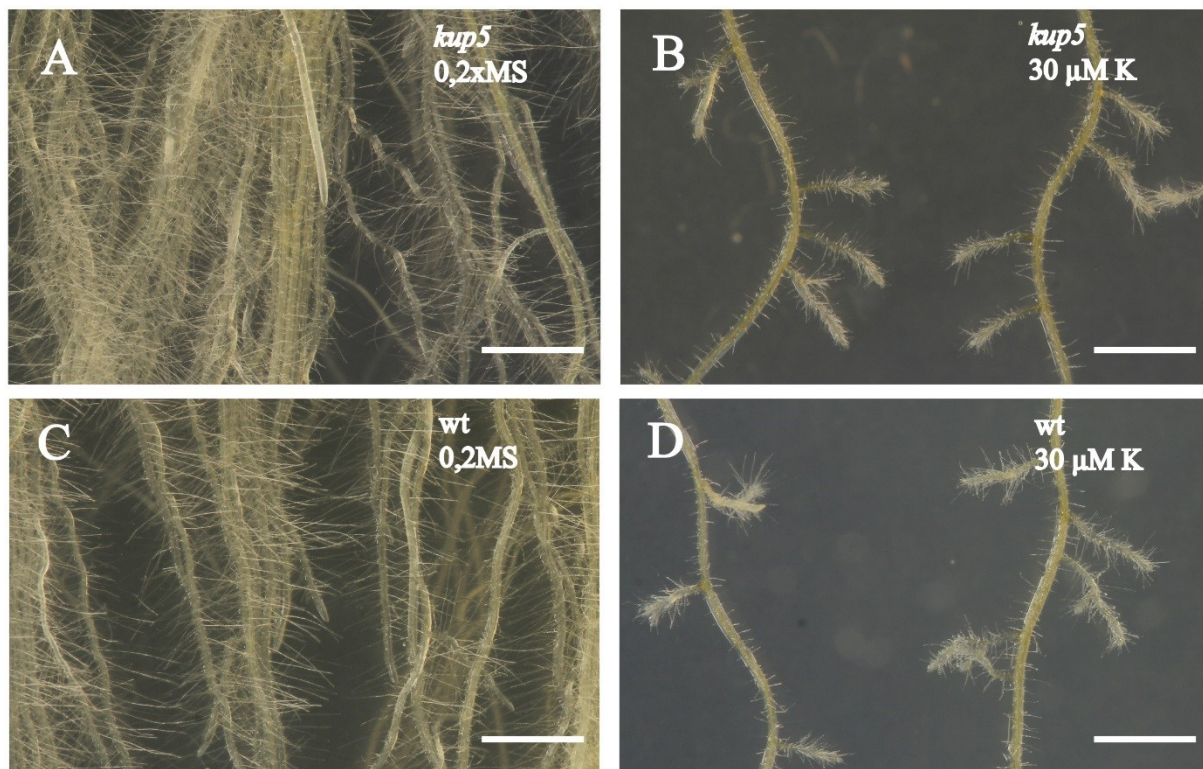
Graf č. 23 – Počet postranních kořenů 1. řádu (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).



Graf č. 24 – Počet postranních kořenů na jednotku délky hlavní osy (průměr ± SE; n = 15-20). Wt – rostliny divokého typu, *kup5* – mutantní rostlina. Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). * značí signifikantní rozdíl mezi wt a *kup5* v konkrétní variantě kultivace (T-test; Mann-Whitney U).

Kořenové vlásky

V experimentu 2 byly také pozorovány kořenové vlásky pod binokulární lupou a byla sledována jejich reakce na snížený obsah K^+ , viz obrázek č. 29. Oba genotypy reagovaly velmi podobně a nebyl pozorován žádný výrazný defekt v růstu vlásků u *kup5* mutantních rostlin.



Obrázek č. 29 - Kořenové vlásky pod binokulární lupou. Wt – rostliny divokého typu; *kup5* – mutantní rostliny. Měřítka 2 mm

Shrnutí výsledků experimentu 2:

1. Výsledky této kultivace potvrzují výsledky z experimentu 1, kdy varianty kultivace výrazně ovlivnily růst obou genotypů. Rostliny rostoucí na sníženém obsahu K^+ vykazovaly zhoršený růst proti rostlinám rostoucím na médiu s plnou dávkou K^+ (pro všechny varianty médií). Na rostlinách byly znatelné typické projevy nedostatku K^+ . Na rozdíl od experimentu 1 se v tomto experimentu ve většině měření růstu kořenového systému projevil signifikantní vliv snížení dávky K^+ , i přestože rostliny byly stresu z nedostatku K^+ vystaveny kratší dobu než rostliny při odběru biomasy.
2. Tento experiment potvrzuje signifikantní rozdíly u médií s plným obsahem K^+ mezi variantami bez NaCl a s 50 mM NaCl. Rostliny na médiích s plným obsahem K^+ a 50 mM NaCl rostly hůře oproti rostlinám bez přidaného NaCl. Na médiích se sníženým obsahem K^+ signifikantní rozdíly nebyly téměř nikde zaznamenány.

3. Podobných výsledků jako v experimentu 1 bylo dosaženo i mezi genotypy. *Kup5* mutantní rostliny měly opět zvýšenou produkci biomasy i délku kořenového systému, na rozdíl od experimentu 1 však tyto rozdíly nebyly tak výrazné ve variantách se zvýšenou salinitou a naopak byly signifikantní ve variantě 0,2xMS.
4. Kořenové vlásky *kup5* mutantních rostlin nevykazovaly viditelný defekt v růstu.

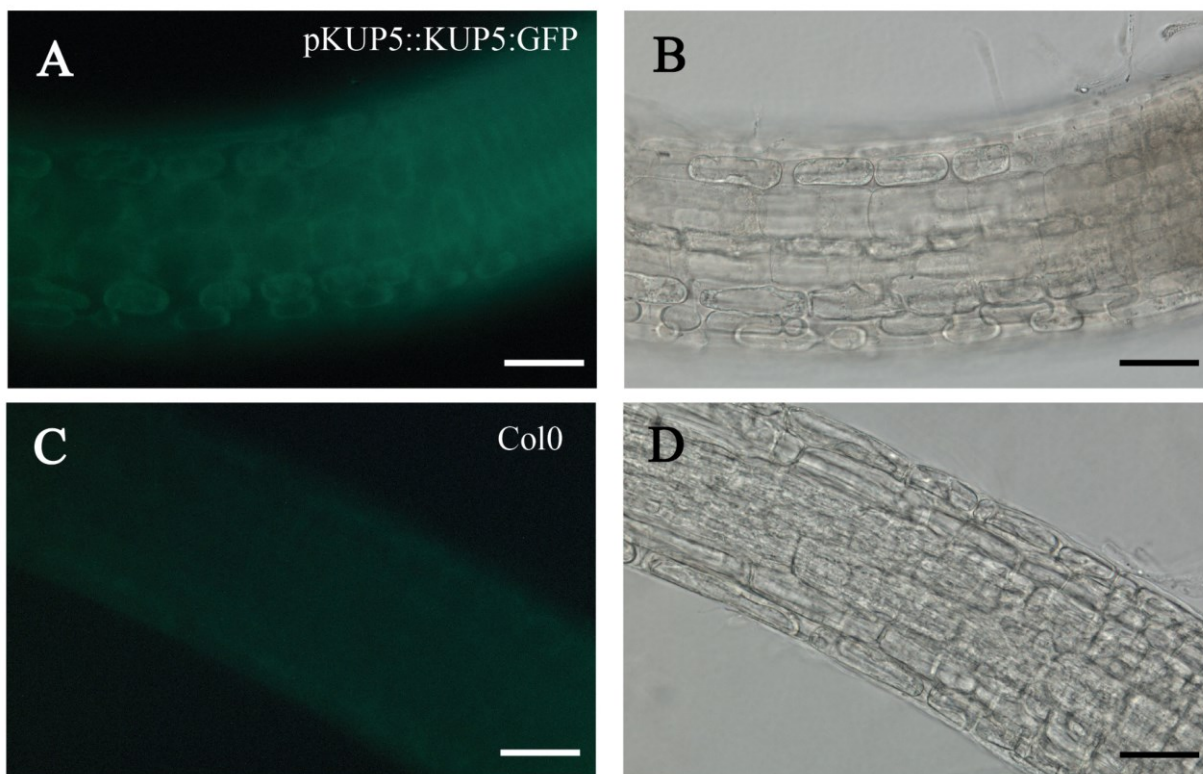
4.3 Lokalizace KUP5:GFP na buněčné úrovni

Pro pozorování lokalizace KUP5 na buněčné úrovni byl vytvořen konstrukt s fluorescenčním proteinem GFP na C konci. Tento konstrukt byl vnesen pod 35S promotorem (*35S::KUP5:GFP*) do *rdr6* mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* a pod nativním promotorem (*pKUP5::KUP5:GFP*) do rostlin *Arabidopsis thaliana* kontrolního typu (ekotyp Col-0). V obou případech bylo vyselektováno několik nezávisle transformovaných linií. Pozorování bylo provedeno nejprve pomocí binolupy a poté mikroskopicky pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu.

4.3.1 Lokalizace KUP5:GFP v rostlinách *Arabidopsis Col-0* nesoucích konstrukt *pKUP5::KUP5:GFP*

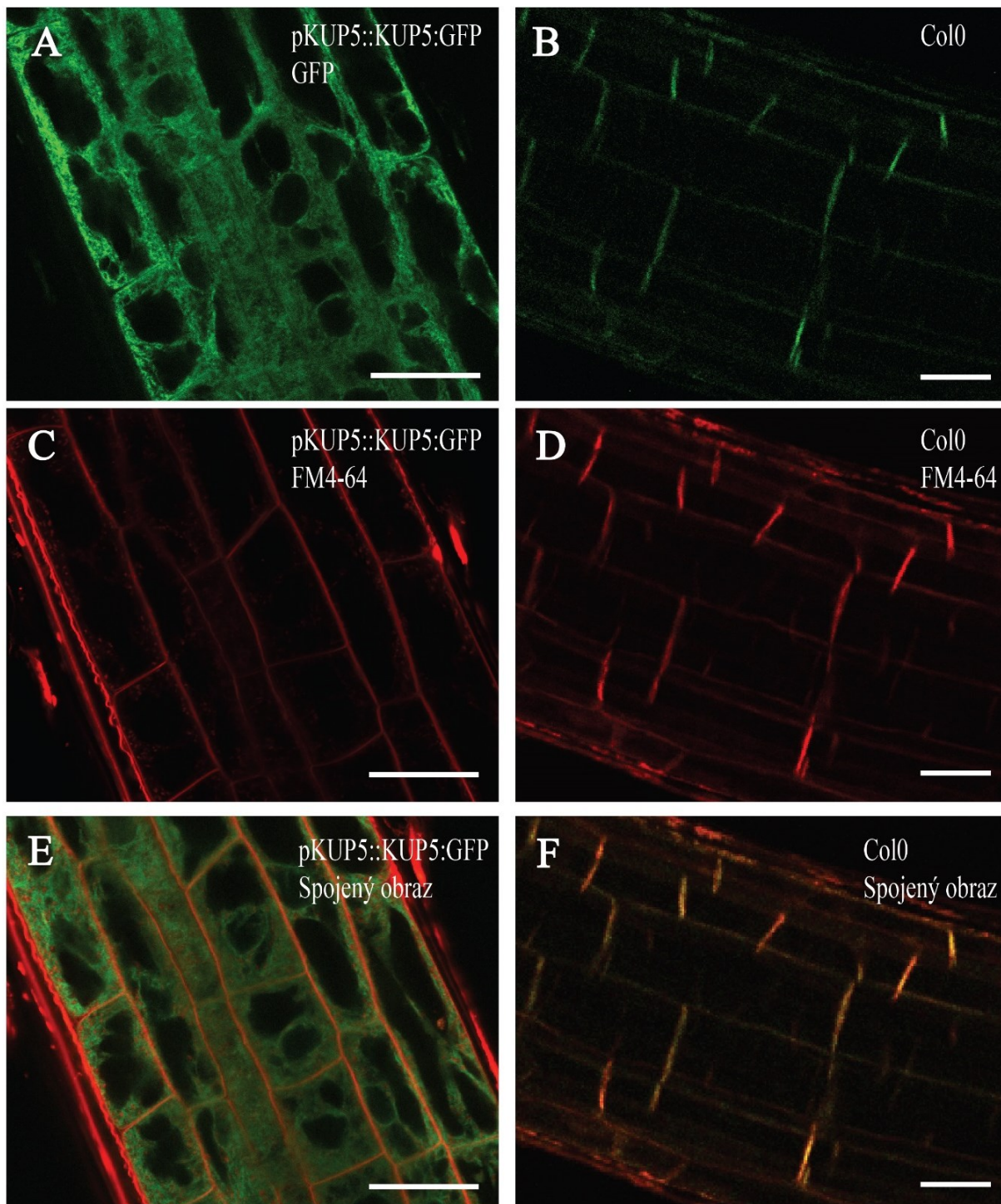
V případě rostlin s vneseným konstruktem pod nativním promotorem nebyly pod binolupou pozorovány žádné rozdíly oproti kontrolním rostlinám Col-0. Při mikroskopickém pozorování již byly pozorovatelné rozdíly v intenzitě fluorescenčního signálu. U kontrolních rostlin byl patrný pouze nepatrný autofluorescenční signál, u transformovaných rostlin byl jasně patrný signál GFP. Rozdíly byly patrné i v intenzitě (ne však v lokalizaci) signálu GFP u jednotlivých transformovaných linií. Pro další experimenty byly vybrány linie s nejvýraznějším signálem.

Při pozorování ve fluorescenčním mikroskopu byl signál u rostlin transformovaných konstruktem pod nativním promotorem zjevný především v buňkách elongační zóny kořenů (viz obrázek č. 30) a v rostoucích vláscích. V již diferencovaných buňkách kořene a starších nerostoucích vláscích tento signál pozorovatelný nebyl. Pro další pozorování byla u rostlin pomocí 1M roztoku KNO₃ navozena plazmolýza, kdy bylo možné ověřit, že signál není autofluorescence buněčných stěn. V plazmolyzovaných buňkách byl signál jasně mimo buněčnou stěnu, přesnější lokalizaci v rámci protoplastu však nebylo možno jednoznačně určit. Tento signál u kontrolních rostlin nebyl zaznamenán (viz obrázek č. 30).



Obrázek č. 30 – Mikroskopické pozorování kořenů transformovaných rostlin *pKUP5::KUP5:GFP* (A, B) a kontrolních rostlin *Arabidopsis Col-0* (C, D). Obrázek A – D – elongační zóna kořene. Vlevo (A, C) jsou obrázky snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu, použit filtr set FITC/EGFP, vpravo (B, D) jsou obrázky ve světlém poli. Měřítka 50 μm .

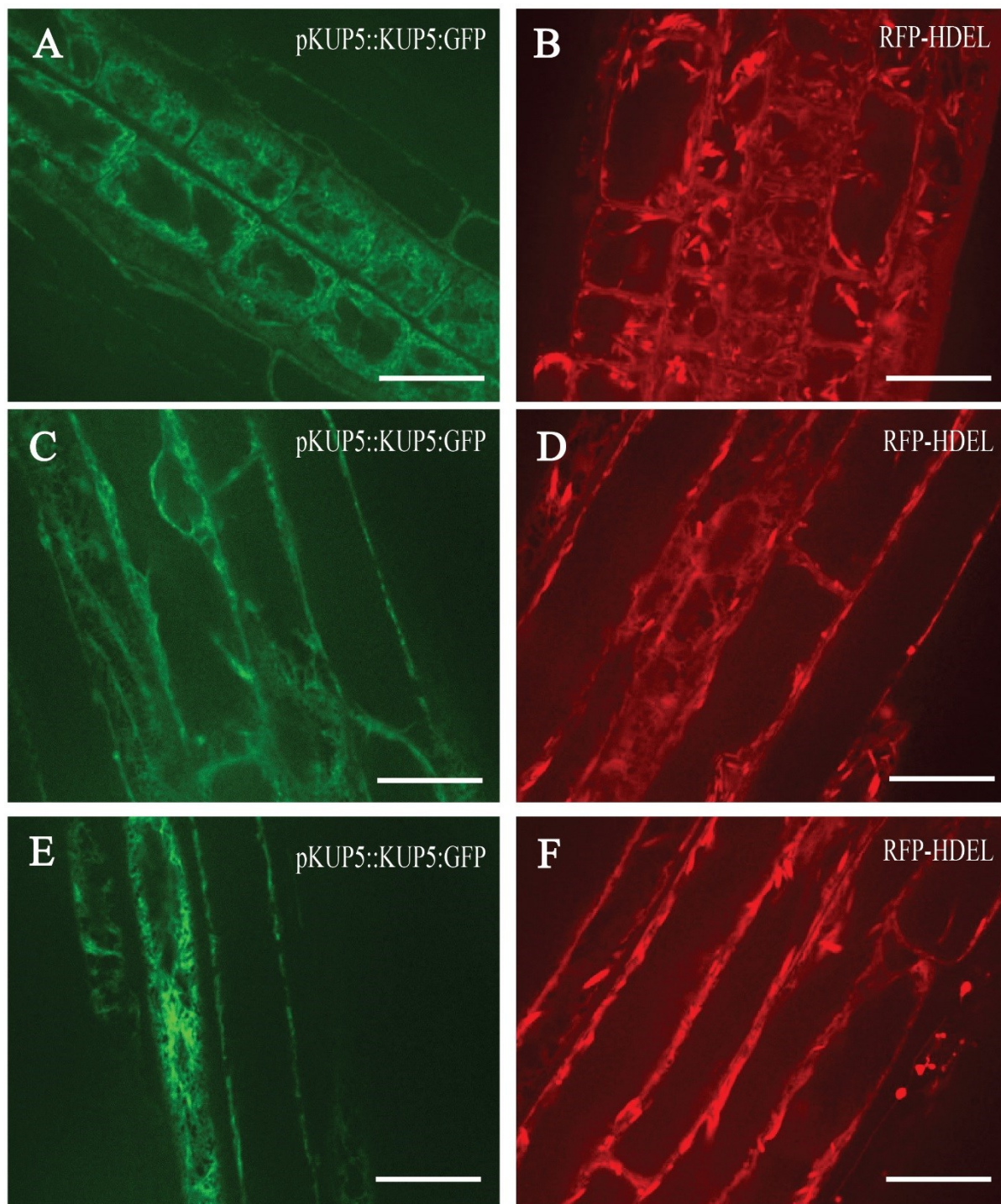
Pro detailnější pozorování KUP5:GFP na buněčné úrovni byly linie s nejvýraznějším signálem sledovány pomocí konfokálního mikroskopu. Při pozorování bylo použito pro přesnější lokalizaci barvení barvivem FM4-64 (po dobu 1 min), které při krátké době barvení barví plazmatickou membránu, po delší době barvení i vnitřní membrány buňky. Na obrázku č. 31A a 31C je viditelné, že signál GFP a FM4-64 se neshodují a lze tedy předpokládat lokalizaci mimo plazmatickou membránu. Dle signálu GFP je předpokládána lokalizace v endoplazmatickém retikulu (obrázek č. 31A).



Obrázek č. 31 – Konfokální fotografie transformovaných rostlin *pKUP5::KUP5:GFP* (A,C,E) a kontrolních rostlin *Arabidopsis Col-0* (B, D, F). Obrázek A, B – signál GFP (rozsah emise u GFP 490 - 550 nm), v buňkách elongační zóny kořene C, D – signál barviva FM4-64 ve stejných buňkách (rozsah emise u FM4-64 600 – 790 nm), E, F – zobrazení nekolokalizace signálů. Měřítka 30 μ m.

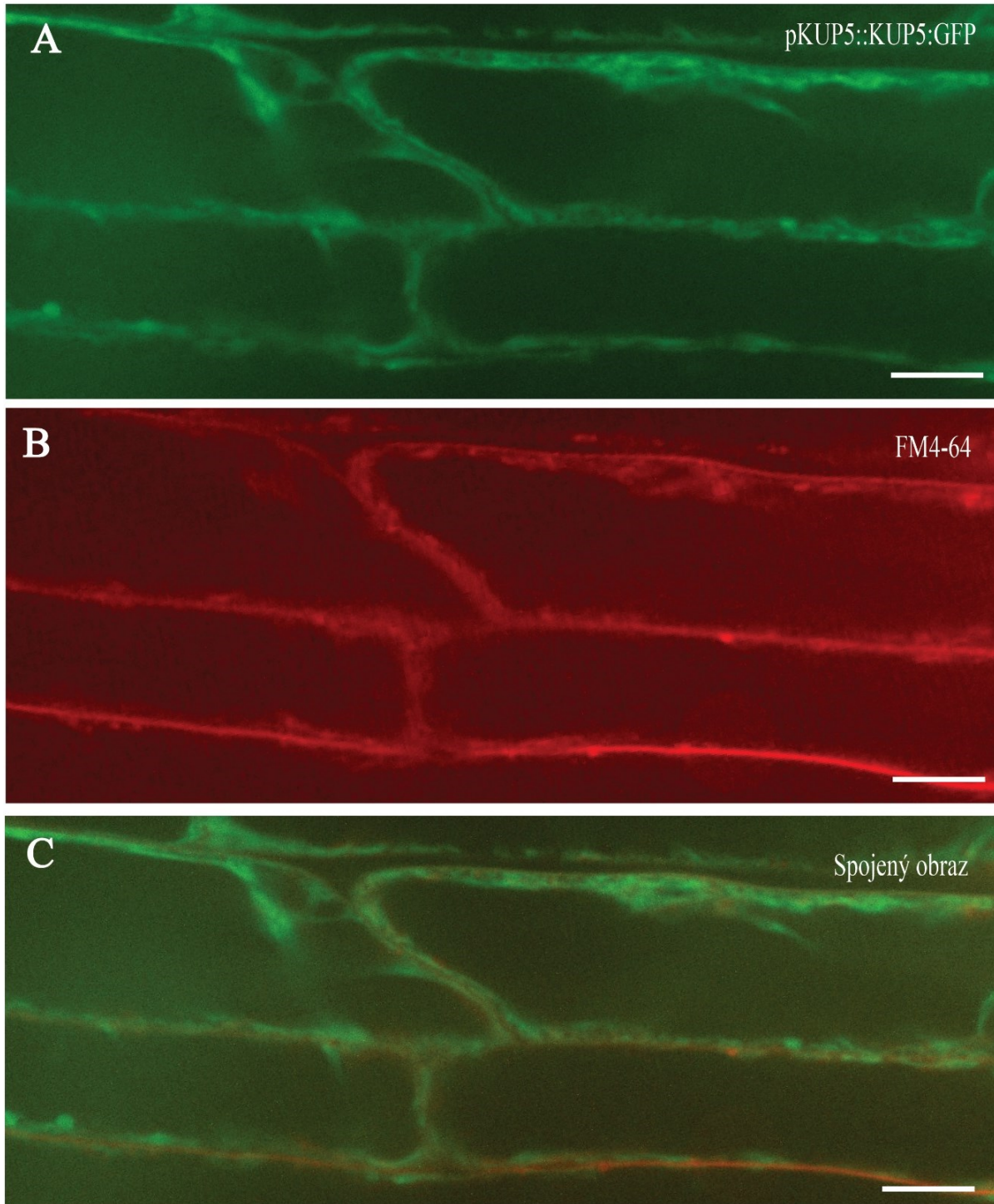
Následně byly transformované rostliny ještě pozorovány pomocí vertikálního konfokálního mikroskopu společně s rostlinami, ve kterých je fluorescenčně značené endoplazmatické retikulum (nesou konstrukt RFP-HDEL), pro potvrzení lokalizace proteinu KUP5 (viz obrázek č. 32). Tato pozorování potvrdila lokalizaci v endoplazmatickém retikulu. Při bližším

pozorování byl signál GFP pozorovatelný i ve starších částech kořene (obrázek č. 32E), což při pozorování ve fluorescenčním mikroskopu nebylo patrné.



Obrázek č.32 – Fotografie buněk rozdílného stáří. Vlevo (A, C, E) – *pKUP5::KUP5::GFP* transformované rostliny (emise u GFP 520 nm), vpravo (B, D, F) – rostliny s fluorescenčně značeným endoplazmatickým retikulem (emise u RFP-HDEL 640 nm). A, B – buňky přechodové zóny, C, D - buňky těsně za elongační zónou, E, F – buňky dále za elongační zónou. Měřítko 20 μ m.

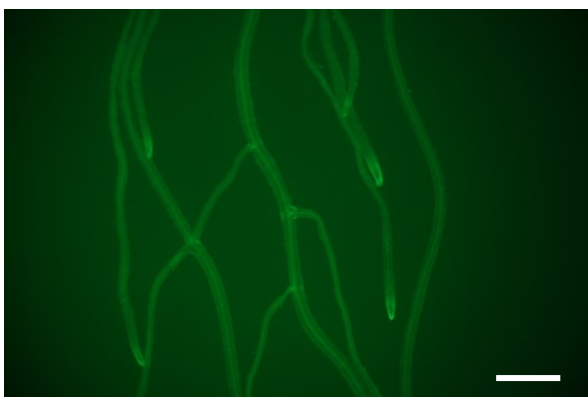
Detailní pozorování již elongovaných buněk potvrzuje, že u rostlin barvených barvivem FM4-64 se signál na plazmatické membrány neshoduje se signálem GFP pozorovaným v transformovaných rostlinách s konstruktem *pKUP5::KUP5:GFP* (obrázek č. 33C).



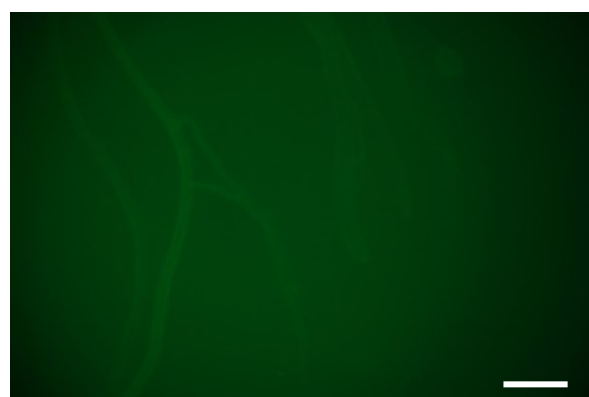
Obrázek č. 33 – Detailní fotografie již elongovaných buněk kořene. A – signál GFP v transformovaných rostlinách (emise u GFP 520 nm), B – barvení PM pomocí barviva FM4-64 (emise u FM4-64 640 nm), C – spojené obrazy A a B. Měřítko 10 μ m.

4.3.2 Lokalizace KUP5:GFP v *rdr6* rostlinách *Arabidopsis* nesoucích konstrukt *35S::KUP5:GFP*

Již při prvním makroskopickém pozorování byl u *rdr6* rostlin s vneseným konstruktem *35S::KUP5:GFP* viditelný rozdíl oproti kontrolním *rdr6* rostlinám. Rozdíly byly pozorovatelné i pod binolupou, kde byla u jednotlivých linií pozorována odlišná intenzita fluorescenčního signálu. Pro další pozorování byly vybrány linie 1 a linie 4, u které byl signál GFP nejintenzivnější (obrázek č. 34). U kontrolních *rdr6* rostlin byl pozorovatelný pouze mírný autofluorescenční signál (obrázek č. 35).



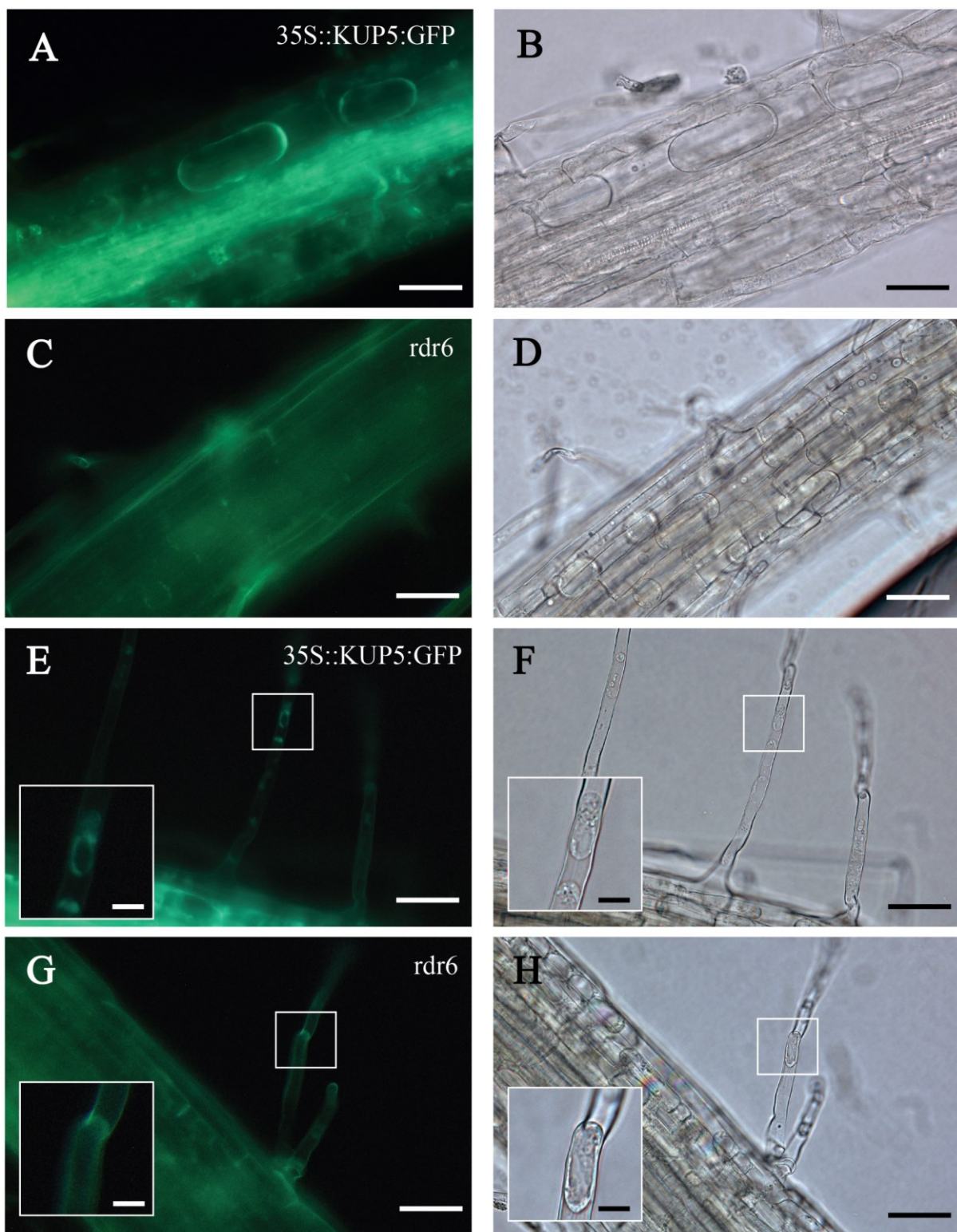
Obrázek č. 34 – Fluorescenční signál v kořenovém systému *35S::KUP5:GFP* transformovaných *rdr6* rostlin *Arabidopsis* (linie 4) pod binolupou s filtrem GFP. Měřítko 1 mm.



Obrázek č. 35 - Fluorescenční signál v kořenovém systému identicky kultivovaných *rdr6* rostlin *Arabidopsis* pod binolupou s filtrem GFP. Měřítko 1 mm.

Při mikroskopickém pozorování byl signál u transformovaných rostlin patrný prakticky ve všech buňkách kořene s poměrně velkou intenzitou, zatímco u *rdr6* rostlin byla pozorovatelná pouze autofluorescence. Po provedení plazmolýzy pomocí KNO_3 bylo možné signál sledovat mimo buněčnou stěnu (obrázek č. 36A). Obdobně byla přítomnost signálu pozorovatelná i u kořenových vlásků transformovaných rostlin po provedené plazmolýze (obrázek č. 36E). U kontrolních *rdr6* rostlin ty signály nebyly pozorovány (obrázek č. 36C, 36G).

Během kultivace rostlin pro mikroskopickou analýzu se ukázalo, že *35S::KUP5:GFP* transformované *rdr6* rostliny vykazují odlišný fenotyp oproti netransformovaným *rdr6* rostlinám. Růstový fenotyp byl proto zhodnocen podrobněji (viz následující kapitola).



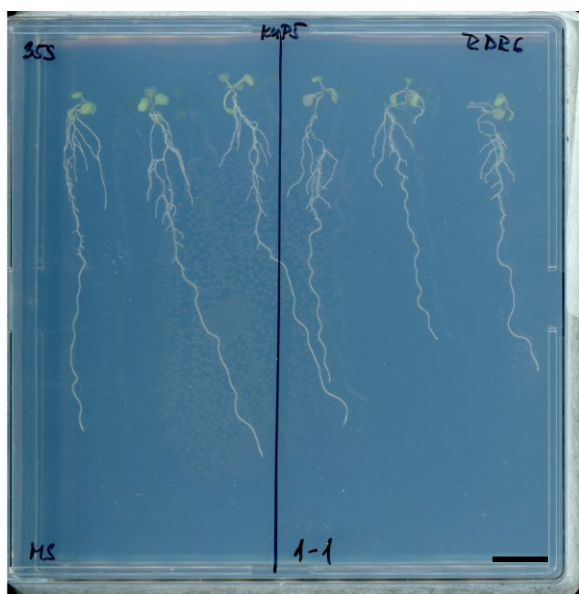
Obrázek č. 36 – Mikroskopické pozorování kořenů *35S::KUP5:GFP* transformovaných *rdr6* rostlin *Arabidopsis* (A, B, E, F) v porovnání s netransformovanými *rdr6* rostlinami (C, D, G, H). A–D – plasmolyzované buňky v oblasti prvních primordií. E–H – kořenové vlásky s detailnějším výřezem. Vlevo (A, C, E, G) jsou obrázky snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu, filtr set Narrow-band EGFP (41020, Chroma) s excitací 470 – 490 nm a emisí 500 – 520 nm, vpravo (B, D, F, G) jsou obrázky ve světlem poli. Měřítko 50 μm , s výjimkou detailních výřezů na obrázcích E – H s měřítkem 10 μm .

4.4. Analýza fenotypu *rdr6* rostlin *Arabidopsis* nesoucích *35S::KUP5:GFP*

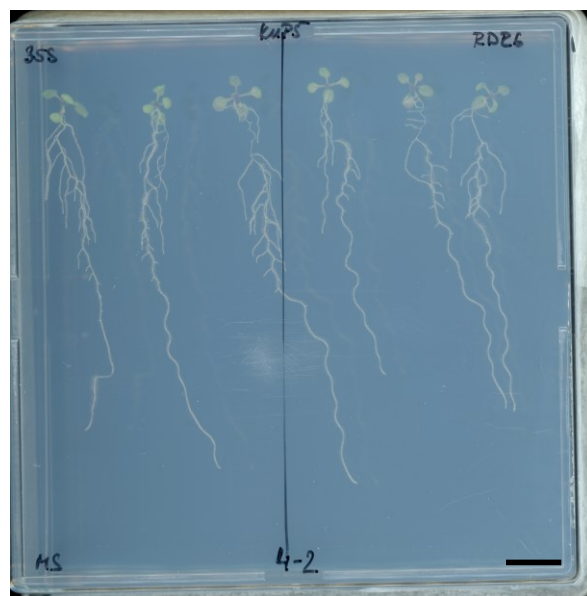
Hodnocení růstového fenotypu *35S::KUP5:GFP* transformovaných *rdr6* rostli bylo provedeno u dvou nezávisle transformovaných linií (35S_linie 1, 35S_linie 4) s nejvýraznějším fluorescenčním signálem KUP5:GFP. Ostatní linie měly signál GFP mnohem méně patrný a nevykazovaly tak výrazné odlišnosti v růstu oproti kontrolním rostlinám, proto nebyl jejich růst detailně hodnocen.

Pro hodnocení růstu byly rostliny pěstovány *in vitro* podmínkách na kontrolním 0,2xMS médiu s 4 mM K⁺ a na médiu s nízkým obsahem K⁺ (30 μM K⁺). Rostliny byly předpěstovány na kontrolním médiu (0,2xMS) a poté přesazeny do jednotlivých variant. Růst kořenového systému byl hodnocen 5. den po přesazení, produkce biomasy dva týdny po přesazení.

Transformované rostliny pěstované na médiu s plným obsahem K⁺ (4 mM K⁺) byly větší oproti netransformovaným rostlinám. Tento fenotyp byl různě výrazný v závislosti na linii. Na obrázcích č. 37, 38 můžeme vidět, že linie 4 (obrázek č. 38) vykazuje výraznější fenotyp, než linie 1 (obrázek č. 37).



Obrázek č. 37 - Kultivační miska s *35S::KUP5:GFP* transformovanými *rdr6* rostlinami (vlevo) a netransformovanými *rdr6* rostlinami (vpravo) – linie 1. 5 dní po přesazení. Měřítka 1 cm.

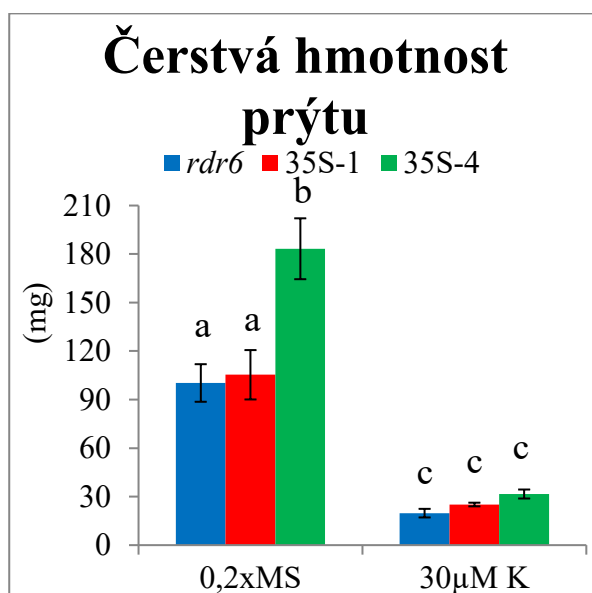


Obrázek č. 38 - Kultivační miska s *35S::KUP5:GFP* transformovanými *rdr6* rostlinami (vlevo) a netransformovanými *rdr6* rostlinami (vpravo) – linie 4. 5 dní po přesazení. Měřítka 1 cm.

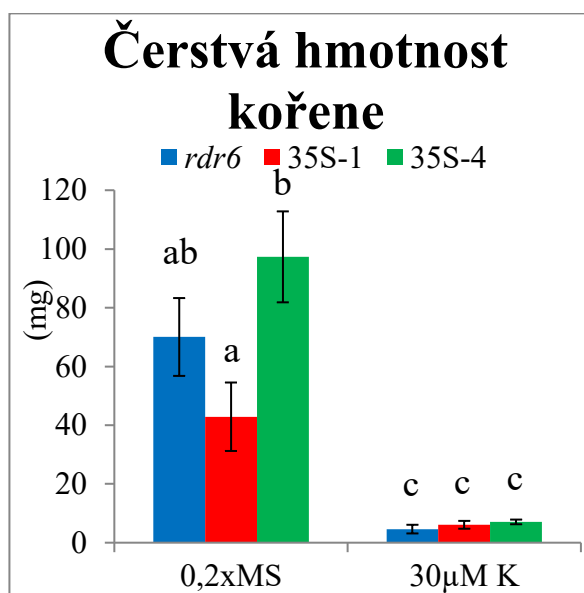
Produkce biomasy rostlin

Rostliny rostoucí na médiích se sníženým obsahem K^+ ($30 \mu M K^+$) vykazovaly zhoršený růst oproti rostlinám rostoucím na médiích s plnou dávkou K^+ ($4 mM K^+$). U rostlin ve variantě $30 \mu M K$ byly výrazně redukovány čerstvé i suché hmotnosti (GLM ANOVA, $p < 0,001$; graf č. 25 – 31) a byl u nich patrný typický projev nedostatku K^+ .

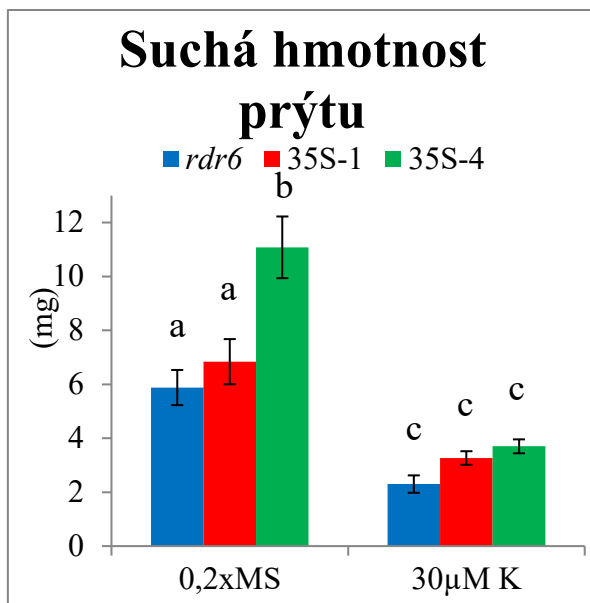
Hodnocení produkce biomasy ukázalo signifikantní rozdíly mezi genotypy (35S_linie 1, 35S_linie 4, *rdr6*) ve většině parametrů (GLM ANOVA, $p < 0,05$). Detailnější analýza pomocí Bonferroni Multiple Comparison testu ukázala signifikantně větší produkci biomasy prýtu i kořenů u linie 4 nesoucí konstrukt *35S::KUP5:GFP* oproti linii 1 nesoucí stejný konstruk a rostlinám *rdr6* ve většině měření na médiu s plnou dávkou K^+ . Na médiích se sníženou dávkou K^+ nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi genotypy.



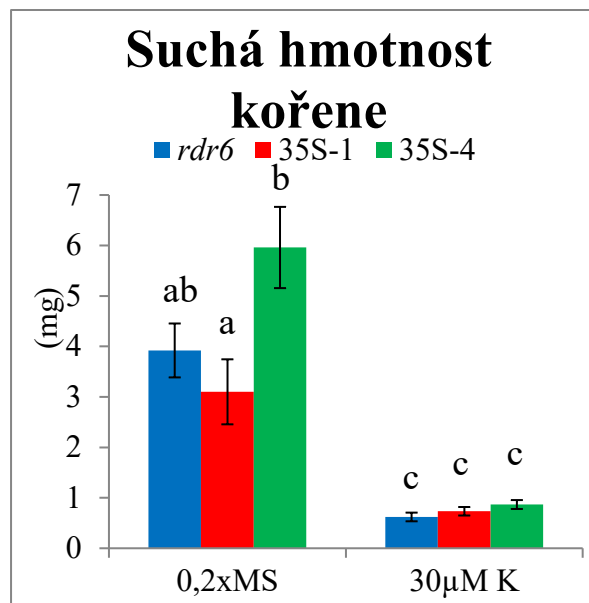
Graf č. 25 – Čerstvá hmotnost prýtu (průměr \pm SE; $n = 10$). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – *35S::KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



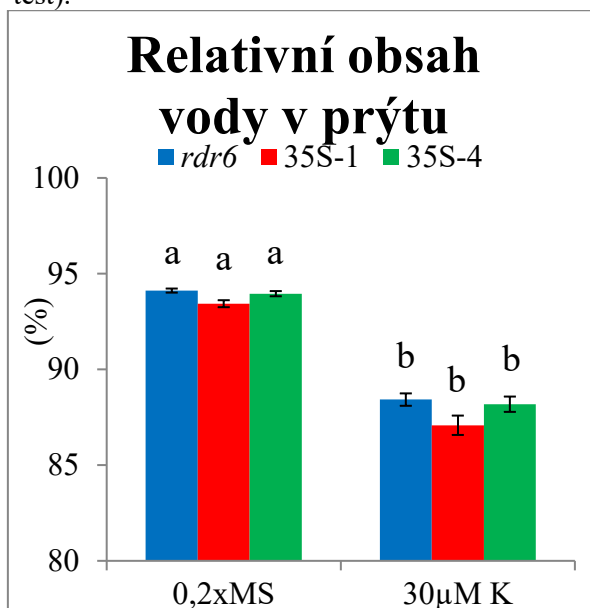
Graf č. 26 – Čerstvá hmotnost kořenů (průměr \pm SE; $n = 10$). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – *35S::KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p < 0,05$ (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



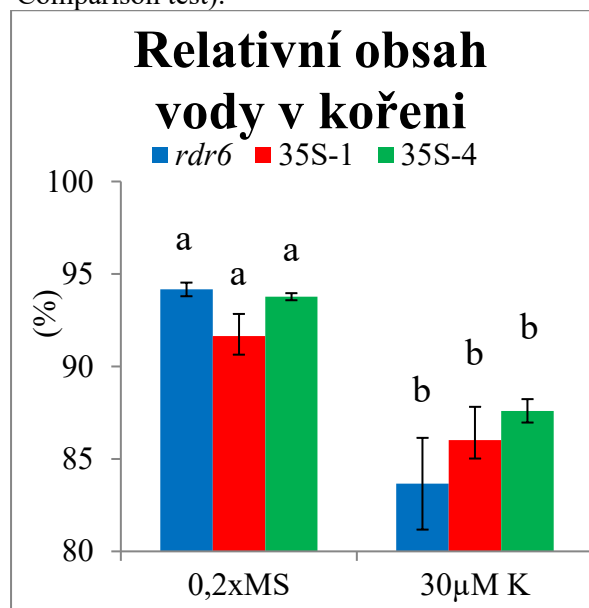
Graf č. 27 – Suchá hmotnost prýtu (průměr ± SE; n = 10). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



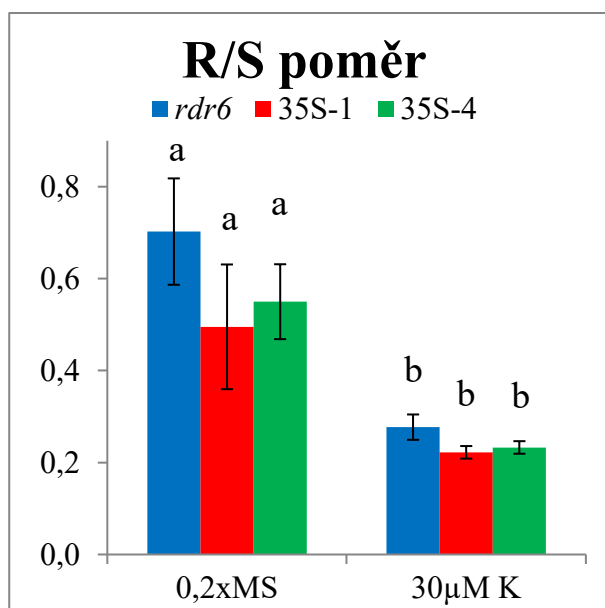
Graf č. 28 – Suchá hmotnost kořenů (průměr ± SE; n = 10). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



Graf č. 29 – Relativní obsah vody v prýtu (průměr ± SE; n = 10). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



Graf č. 30 – Relativní obsah vody v kořenech (průměr ± SE; n = 10). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p < 0,001 a genotypy p > 0,05 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).

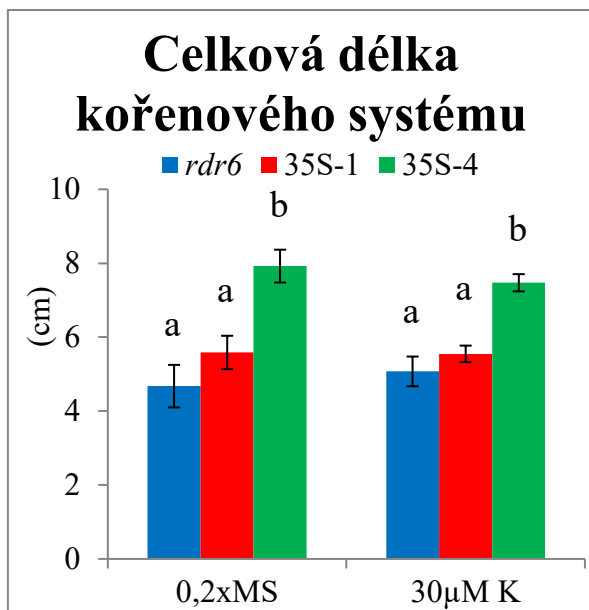


Graf č. 31 – Poměr biomasy kořenů k biomase prýtu (R/S poměr; průměr ± SE; n = 10). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).

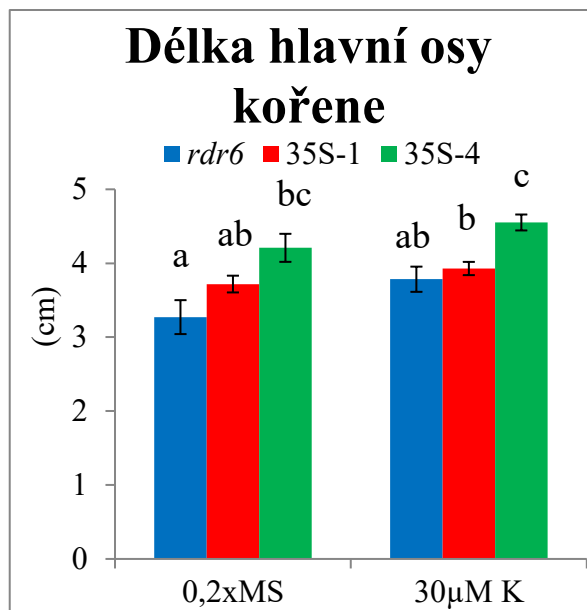
Růst kořenového systému

Růst kořenového systému byl detailně analyzován 5. den po přesazení rostlin do variant. Výsledky měření délek kořenů neukázaly téměř žádné signifikantní rozdíly mezi variantami kultivace – celková délka kořenového systému, celková délka postranních kořenů, celkový počet postranních kořenů, počet postranních kořenů na jednotku délky (GLM ANOVA, $p > 0,05$; graf č. 32 – 46).

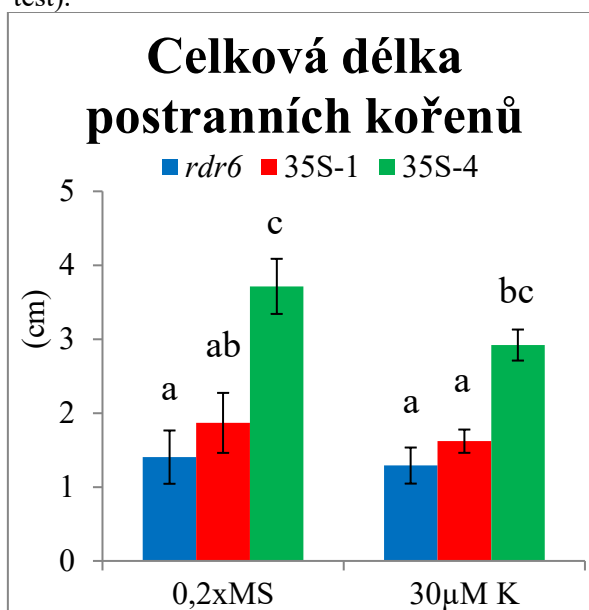
Signifikantně však vychází rozdíly mezi genotypy ve všech měřených parametrech (GLM ANOVA, $p < 0,001$). Výsledky ukazují, že rostliny z linie 4 nesoucí 35S::*KUP5:GFP* dosahují signifikantně větších hodnot ve všech parametrech měření oproti *rdr6* rostlinám, ale také oproti rostlinám z linie 1, které nesou stejný konstrukt. A to na médiích s plnou dávkou K^+ i ve variantě s nižším obsahem K^+ (viz graf č. 32 – 36). Linie 1 také vykazovala mírně vyšší hodnoty oproti *rdr6* rostlinám v obou variantách kultivace, rozdíly však nebyly téměř nikde signifikantní (GLM ANOVA, $p > 0,05$).



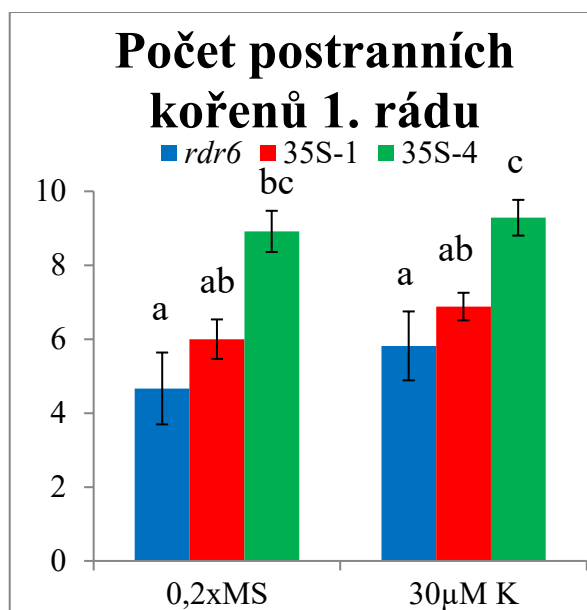
Graf č. 32 – Celková délka kořenového systému (průměr ± SE; n = 10-20). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p > 0,05 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



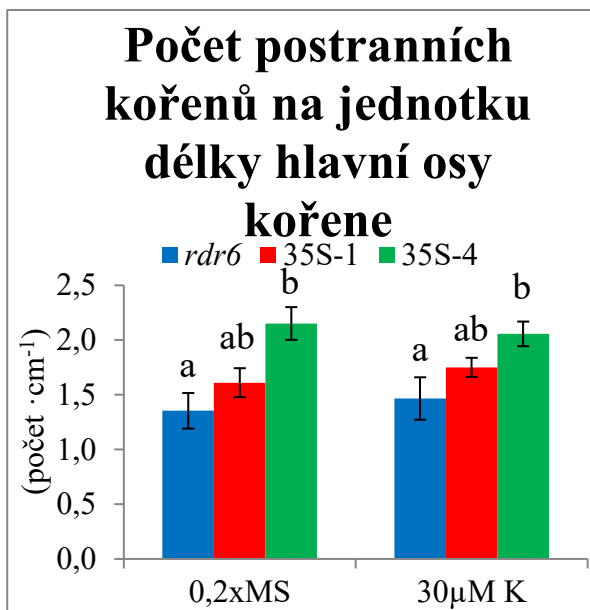
Graf č. 33 – Délka hlavní osy kořene (průměr ± SE; n = 10-20). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p < 0,05 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



Graf č. 34 – Celková délka postranních kořenů (průměr ± SE; n = 10-20). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p > 0,05 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



Graf č. 35 – Počet postranních kořenů 1. řádu (průměr ± SE; n = 10-20). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5:GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami p > 0,05 a genotypy p < 0,001 (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).



Graf č. 36– Počet postranních kořenů na jednotku délky hlavní osy kořene (průměr ± SE; n = 10-20). *Rdr6* – netransformovaná rostlina, 35S-1 a 4 – 35S::*KUP5*:*GFP* transformovaná rostlina (linie 1 a 4). Rozdíly mezi variantami $p > 0,05$ a genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA). Jednotlivá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi variantami (Bonferroni Multiple Comparison test).

Shrnutí výsledků experimentu 35S::*KUP5*:*GFP*

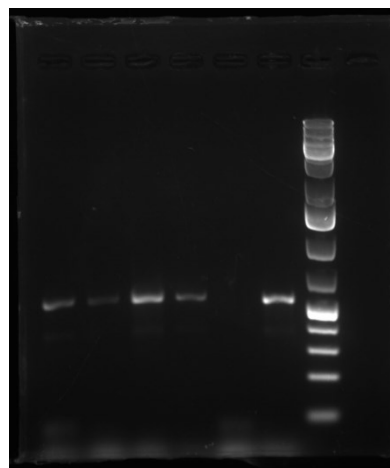
1. Produkce biomasy byla negativně ovlivněna snížením obsahu K^+ , statistická analýza ukázala signifikantní vliv variant kultivace v produkci biomasy (GLM ANOVA, $p < 0,001$), nebylo tomu tak v měření růstu kořenového systému, kde rozdíly ve variantách kultivace nejsou signifikantní. Rozdíl je zřejmě způsobem krátkým vystavením rostlin stresovým podmínkám v případě měření růstu kořenového systému.
2. Jednotlivé genotypy se liší v produkci biomasy (GLM ANOVA, $p < 0,05$) i délce kořenového systému (GLM ANOVA, $p < 0,001$). Nejvýraznější je zde transformovaná linie 4, která vykazuje zvýšenou produkci biomasy a délku kořenového systému oproti netransformovaným *rdr6* rostlinám i linii 1. Linie 1 se od netransformovaných *rdr6* rostlin signifikantně neliší.

4.4 Lokalizace exprese *KUP5* v rámci rostliny pomocí transkripční fúze *pKUP5::GUS*

Pro nalezení lokalizace exprese genu *KUP5* v rostlině byl vytvořen konstrukt s nativním promotorem genu *KUP5* a reportérovým genem pro GUS. Zmíněný konstrukt byl vnesen do rostlin *Arabidopsis thaliana* Col0 společně s rezistencí pro herbicid BASTA. U rostlin, které rostly dál i po ošetření herbicidem (obrázek č. 39) byla pomocí genotypování ověřena přítomnost reportérového genu (obrázek č. 40) a získáno několik nezávisle transformovaných linií. U transformovaných rostlin bylo provedena detekce aktivity GUS, ale nebylo možno ji v rostlinách nikde pozorovat. Sekvenací byla ověřena správnost vneseného konstrukt i sekvence genu pro GUS, přesto však, i při opakování experimentu, nebylo možné detekovat žádnou GUS aktivitu. Lze předpokládat chybnou funkčnost vektoru nesoucího sekvenci genu pro GUS (pEN-L1-S-L2), protože problémy s tímto vektorem byly zaznamenány i v jiných experimentech.



Obrázek č. 39 – Transformované rostliny s konstruktem *pKUP5::GUS* po selekci herbicidem BASTA



Obrázek č. 40 – Potvrzení přítomnosti reportérového genu pro GUS u jednotlivých linií. DNA žebříček (1 kb+)

5 Diskuze

5.1 Hodnocení růstu homozygotních mutantů *kup5* oproti rostlinám divokého typu

Za účelem charakterizovat možné fenotypové rozdíly mezi homozygotními mutanty *kup5* a rostlinami divokého typu jsem provedla experimenty s různými variantami podmínek. Dle mých výsledků se jeví jako jednoznačný rozdíl větší velikost kořenového systému i větší celková produkce biomasy homozygotních mutantů *kup5* oproti rostlinám divokého typu, napříč všemi podmínkami prostředí, kterým jsem rostliny v rámci experimentů vystavila (kontrolní podmínky, nedostatek draslíku, zvýšená salinita i sušší pevnější agarové medium). Kromě větší celkové délky kořenového systému je u *kup5* mutantních rostlin ve většině variant patrný i vyšší počet postranních kořenů.

Dle čipových dat (*Arabidopsis* eFP Browser) by měl být *KUP5* exprimován v celé rostlině, téměř ve všech nadzemních orgánech i v kořenech, v rámci kořene pak především v elongační zóně. To by společně s naměřenými výsledky mohlo naznačovat, že je transportér *KUP5* zapojen do regulace toku K^+ a tím do regulace turgoru napříč rostlinou, což ovlivňuje i objemový růst buněk. Tuto teorii by mohly podpořit i výsledky, které uvedl Ahn (2004) ve své práci, kdy byla nejsilnější exprese *KUP5* detekována pomocí qRT-PCR v mladších listech, méně již ve starších listech, také v kořenech a vyvíjejících se šesulích.

Podobný fenotyp jako mutantní rostliny *kup5* vykazují mutantní rostliny *kup2,6,8*, což publikoval Osakabe (2013) se svým týmem. Je proto možné, že se transportér *KUP5* podílí na výdeji K^+ a tím reguluje turgor, podobně jako tomu je u transportérů *KUP2*, *KUP6* a *KUP8*. U mutantů v těchto genech byla zaznamenána větší hmotnost sušiny a větší velikost rostliny, která souvisela s větším objemovým růstem jednotlivých buněk (měřeno u buněk listového mezofylu). Výrazný fenotyp se nicméně projevil především u dvojitých a trojitých mutantů, u jednoduchých mutantů nebyl výraznější fenotyp patrný (Osakabe et al. 2013). U *kup5* mutantních rostlin byla předpokladem pro větší velikost rostlin také větší velikost buněk, což se však zatím neprokázalo. V pilotním experimentu nebyly nalezeny signifikantní rozdíly ve velikosti buněk kořene, ale toto měření bude nutné měření opakovat na větším souboru rostlin a možná i v různých podmínkách kultivace a analyzovat různé části rostliny (data proto nejsou v diplomové práci uvedena). U jiných *KT/HAK/KUP* mutantů nebyl takový růstový fenotyp zaznamenán, mutantní rostliny byly většinou celkově menší než rostliny divokého typu a měly kratší kořenový systém, především při nedostatku K^+ . Bližší zhodnocení fenotypových projevů jednotlivých mutantů při nízkém obsahu K^+ viz kapitola 5.1.1.

Důležitou otázkou proto je, kde je transportér KUP5 v rámci buňky lokalizován a jakým způsobem se podílí na transportu K^+ . Dle dat z Cell eFP Browser (Winter et al. 2007) je předpokládána lokalizace proteinu KUP5 na plazmatické membráně, i když byla publikována i data naznačující jeho lokalizaci na tonoplastu (Jaquinod et al. 2007). Moje mikroskopická pozorování naznačují lokalizaci na endoplazmatickém retikulu, což bude dále diskutováno v kapitole 5.2. V některých pracích bylo publikováno, že transportér KUP5 zajišťuje vstup K^+ do buňky (Al-Younis et al. 2018). Naznačuje to experiment, který byl proveden u *Saccharomyces cerevisiae*. Pokud měl kvasinkový mutant narušený vysokoafinitní transport K^+ , bylo ho možné obnovit expresí genu kódujícího transportér AtKUP5. Kvasinkový mutant byl poté schopen přijímat K^+ , což ukazuje schopnost transportéru KUP5 transportovat K^+ do buňky. To však nekoresponduje s možnou podobností mezi funkcí KUP5 a KUP2,6 a 8, které jsou lokalizované na plazmatické membráně a zprostředkovávají výdej K^+ z buňky (Osakabe et al. 2013). Pokud nefungují, výdej K^+ je menší a turgor buněk během růstové fáze větší, což způsobuje větší výslednou velikost buněk, pozorovanou u *kup2,6,8* mutantní rostliny (Osakabe2013).

Další možností, která by mohla ovlivňovat pozorovaný fenotyp *kup5* mutantních rostlin je adenylátcyklázová aktivita, kterou zjistil Al-Younis a spoluautoři (2018) u transportéru KUP5, s katalytickým místem pro AC na N konci. Pokud je narušena AC aktivita, není tento transportér schopen přijímat K^+ , což bylo experimentálně prokázáno expresí nekompletního *KUP5* genu u kvasinky.

Ačkoliv jsem neověřovala absenci KUP5 proteinu u mutantních rostlin, je zde malá pravděpodobnost, že by mohl vzniknout alespoň částečně funkční protein. T-DNA inserce se u mnou používané SALK linie nachází v 5. exonu z celkových 10 exonů a lze tedy předpokládat, že by se zde určitě neposkládaly správně všechny transmembránové části. Pokud by však došlo ke vzniku částečného transkriptu a následně částečného proteinu, mohla by být AC aktivita v nějaké podobě přítomná i v *kup5* mutantech. Tuto aktivitu jsem neměřila a nemohu tedy tento případ vyloučit. Pokud by však byl protein kompletně vyřazený, je možné, že by chybějící AC aktivita mohla narušit regulaci některých dalších transportérů K^+ a tím ovlivnit toky K^+ v buňce. Recentně se totiž uvažuje o možnosti, že KUP5 funguje jako senzor toku K^+ a prostřednictvím své AC aktivity reguluje další draselné transportéry či kanály v buňce (Al-Younis et al. 2018).

Jednoznačný závěr o roli transportéru v toku draslíku na úrovni buňky i celé rostliny nemusí být vždy jednoduché učinit, což ukazují výsledky získané pro některé další transportéry z rodiny KT/HAK/KUP. Výsledky jednoho experimentu mohou vést k závěru, že transportér

zajišťuje vstup K^+ do buňky, zatímco výsledky jiného nezávislého experimentu ukazují, že ten samý transportér zajišťuje výdej z buňky, aniž by se tyto dva experimenty přímo vyvracely. Jedním z příkladů je např. transportér KUP9, kde Kobayshi (2010) s jeho týmem zjistili, že transportér KUP9 zajišťuje vstup K^+ do buňky pomocí exprese *AtKUP9* v mutantu *Escherichia coli*, který byl defektní v příjmu K^+ . Pokud byl v mutantu *E.coli* exprimován *AtKUP9*, byl tento mutant schopen růst na médiu s nízkým obsahem K^+ , zatímco mutantní bakterie neexprimující KUP9 toho schopny nebyly. Naproti tomu Zhang (2020) s jeho týmem tvrdí, že transportér KUP9 zajišťuje výdej K^+ na základě experimentu s oocyty *Xenopus laevis*. V tomto experimentu byl pozorován výdej K^+ spolu s auxinem. U *Arabidopsis* je KUP9 lokalizovaný především v klidovém centru kořene a je důležitý pro růst kořenů. Při nízké hladině K^+ se u mutantů *kup9* projevuje fenotyp se zkrácenými kořeny, a dokonce snížený počet buněk kořene. Tyto rostliny mají zvýšenou dělivou schopnost buněk klidového centra, kterou lze zvrátit exogenním podáním auxinu. Toto naznačuje, že KUP9 ovlivňuje homeostázi auxinu v buňkách klidového centra. Při deficienci K^+ je transportér KUP9 převážně lokalizován v ER, kde zřejmě zajišťuje odtok K^+ a auxinu z lumenu ER do cytoplazmy v buňkách klidového centra a reguluje tak K^+ homeostázi. U *kup9* mutantních rostlin nebyla redukována nadzemní část rostliny ani obsah K^+ v buňkách kořene. Při plné dávce K^+ tyto změny v růstu kořenového systému a frekvenci dělení buněk klidového centra zaznamenány nebyly. Tyto výsledky naznačují zapojení transportéru KUP9 pouze do regulace růstu kořenu při nízké hladině K^+ a jeho funkce je nezávislá na příjmu K^+ (Zhang et al. 2020). Jako další příklad lze uvést transportér KUP7, u kterého Han a spoluautoři (2016) dokumentovali, že zajišťuje příjem a přenos K^+ v kořeni *Arabidopsis thaliana* zejména za nízkého obsahu K^+ . Tato měření souhlasí s výsledky, které publikoval Ahn a spoluautoři (2004). Ti v experimentu s *E. coli* zjistili, že je KUP7 vysokoafinitní transportér. V další práci ale jiní autoři pozorovali, že KUP7 může zprostředkovávat i nízkoafinitní transport, kdy byl v kvasinkách schopen zprostředkovat příjem K^+ při externí koncentraci K^+ 500 μ M (Han et al. 2016). Protein KUP7 může být regulován fosforylací a lze spekulovat nad tím, že v kvasinkách mohou chybět kinázy pro správnou regulaci aktivity KUP7. Při nedostatku K^+ dochází u *kup7* mutantních rostlin *Arabidopsis* ke snížení rychlosti příjmu K^+ a snížené koncentrace K^+ v xylémové šťávě (Han et al. 2016). Transportér KUP7 je lokalizován na plazmatické membráně a exprimován v epidermis a kořenových vláscích a vyšší exprese byla zaznamenána i ve stéle kořene, což může vést k myšlence propojení s transportem do xylému. Předpokládá se, že KUP7 zajišťuje vstup K^+ do parenchymatických buněk xylému, kde

následně jiné transportéry (např. kanál SKOR) zprostředkovávají uvolňování K^+ do apoplastu xylému.

KUP5 a KUP7 jsou si strukturně podobné (Nieves-Cordones et al. 2016). Jednou z podobností mezi KUP7 a KUP5 je jejich relativní exprese v různých částech rostliny, která vykazuje stejný trend (Ahn 2004). V obou případech se nejvíce exprimují v mladších listech, a naopak nejméně v květech, KUP5 dokonce v nedetekovatelné míře. Dalším společným znakem je jejich adenylátcyklázová aktivita. Avšak experimenty, které provedl Han (2016) říkají, že mutantní rostliny *kup7* nejsou větší oproti rostlinám divokého typu, jako je tomu u mutantních rostlin *kup5*. Jsou zde tedy určité podobnosti mezi těmito dvěma transportéry, které by mohly naznačovat podobnou funkci, ale jsou zde i odlišnosti, které tyto spekulace nepotvrzují.

Již u dvou transportérů z rodiny KT/HAK/KUP byla také popsána provázanost s auxinem. Je možné, že i u transportéru KUP5 může fenotypový projev T-DNA inzerčního mutantu v KUP5 genu ovlivňovat více faktorů a může být nějakým způsobem zapojen do auxinové homeostáze. Pokud by se tedy neprokázala provázanost mezi regulací turgoru, velikostí buněk a větší velikostí *kup5* mutantních rostlin, dalo by se spekulovat, že by větší velikost *kup5* mutantních rostlin mohla být spojena s auxinovou signalizací, potažmo pozměněnou aktivitou meristémů.

Jedním z transportérů KT/HAK/KUP rodiny, u kterého byla prokázána spojitost s auxinem je KUP9. Mutantní rostliny *kup9* vykazovaly zvýšenou dělivou schopnost buněk klidového centra při nedostatku K^+ , což vedlo k narušení meristemické aktivity a inhibici růstu kořene (Zhang et al. 2020). Autoři uzavírají, že je KUP9 nezbytný pro udržování auxinové homeostázy apikálního meristému kořene, zprostředkovává výdej K^+ a auxinu z ER do cytoplasmy a udržuje tak růstovou aktivitu kořene v K^+ deficientních podmínkách.

Jinak tomu je u druhého transportéru TRH1/KUP4, kde také byla popsána souvislost s auxinem. Tento transportér je také schopen kromě transportu K^+ zprostředkovávat i transport auxinu (Rigas et al. 2013, Daras et al. 2015). Dle experimentů, které provedl Rigas (2001), mají *trh1/kup4* mutantní rostliny narušený gravitropismus a růst kořenových vlásků. *Trh1/kup4* vykazují silně narušený apikální růst kořenových vlásků a tento fenotyp je možné zvrátit externě dodaným auxinem nikoli zvýšenou dostupností K^+ . U *kup5* mutantních rostlin jsem žádný defekt v růstu kořenových vlásků nepozorovala. Ani gravitropická odpověď *kup5* mutantních rostlin se nezdála být viditelně narušena, proto nebyla detailně analyzována a data nejsou v diplomové práci zařazena.

Roli KUP5 v rostlině (v transportu K^+ či jiných procesech) bude proto třeba dále analyzovat v navazujících experimentech. Je také třeba ověření růstového fenotypu s využitím nezávislé T-DNA inzerční linie, na kterém pracuje ve své diplomové práci Bc. Barbora Čabelková.

5.1.1 Reakce na nedostatek K^+ v prostředí

Porozumět roli KUP5 v rostlině může analýza růstové reakce *kup5* mutantních rostlin v podmínkách nedostatku K^+ , protože pro řadu členů rodiny KT/HAK/KUP byla prokázána role v transportu draslíku právě za těchto podmínek. Proto jsem ve svých experimentech pěstovala rostliny také na médiích s nízkou koncentrací draslíku ($30\mu M K^+$).

Rostliny při nízké dostupnosti K^+ snižují produkci biomasy a mění architekturu kořenového systému. Konkrétně u *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col-0 Shin a Schachtman (2004) zaznamenali silné snížení rychlosti růstu postranních kořenů v K^+ deficientních podmínkách. V jejich experimentech však nebyla pozorována kratší osa hlavního kořene, zatímco v jiných experimentech, které provedli Jung (2009) a Kim (2010) se svými týmy bylo zkrácení délky hlavního kořene pozorováno. Kultivační podmínky se v těchto experimentech příliš nelišily a všichni pracovali s ekotypem Col-0, přesto však dosáhli jiných výsledků. Kellermeier a spoluautoři (2013) provedli podrobný výzkum, ve kterém srovnávali jednotlivé ekotypy *Arabidopsis thaliana*. Dle jejich pozorování byly rozdíly mezi ekotypy znatelné již za kontrolních podmínek, ty se však mnohem více prohloubily při nedostatku K^+ . Ekotyp Col-0 vykazoval v těchto experimentech nižší celkovou délku kořenového systému a kratší délku především postranních kořenů, zatímco délka hlavní osy kořene nebyla tolik ovlivněna. Je tedy patrné, že u tohoto ekotypu reagují na nedostatek K^+ citlivěji postranní kořeny než kořen hlavní, u jiných ekotypů ale může být reakce i opačná.

Rostliny v mých experimentech také vykazovaly typické projevy nedostatku K^+ jako jsou redukce biomasy, chlorózy listů a změna architektury kořenového systému. Byla pozorována výrazná redukce tvorby biomasy prýtu i kořenů při nedostatku K^+ oproti rostlinám rostoucím na médiích s plným obsahem K^+ . Mutantní rostliny *kup5* nicméně reagovaly na snížení obsahu K^+ velmi podobně jako rostliny divokého typu. Dle provedených experimentů se tedy u mutantních rostlin *kup5* neprojevil výrazný fenotyp spojený s nedostatkem K^+ . Na rozdíl od mutantů v jiných transportérech KT/HAK/KUP rodiny, např. transportéru HAK5 nebo KUP9. Mutantní rostliny *hak5* při velmi nízké koncentraci K^+ vykazovaly menší velikost oproti kontrolním rostlinám. Při vyšší koncentraci K^+ však žádné rozdíly zaznamenané nebyly (Qi

et al. 2008). Jak již bylo zmíněno výše, u mutantních rostlin *kup9* je při nedostatku K^+ pozorovatelné signifikantní zkrácení kořenů a snížení počtu buněk kořene (Zhang et al. 2020). Dle mých pozorování se proto zdá, že transportér KUP5 pravděpodobně nezajišťuje vstup K^+ do rostliny z prostředí a není klíčový pro příjem při nízké externí koncentraci K^+ , jako je tomu u transportéru HAK5 a zřejmě i transportéru KUP7. Je tedy možné, že KUP5 se bude podílet na regulaci distribuce K^+ v rostlině bez ohledu na dostupnost v okolním prostředí. Konkrétnější závěry by však bylo možné stanovit po ověření, v jakých částech rostliny se KUP5 exprimuje a doplnit tak údaje z čipových dat, která naznačují expresi v celé rostlině. Snažila jsem se analyzovat lokalizaci exprese pomocí transkripční fúze promotoru KUP5 genu s reportérovým genem pro glukuronidázu (konstrukt *pKUP5::GUS*). Tento konstrukt však nefungoval. Je pravděpodobné, že námi použitý vektor nesoucí sekvenci GUS nefunguje správně, protože ani v jiných experimentech s tímto vektorem nebylo možné detekovat žádnou GUS aktivitu u transformovaných rostlin. Je tedy nutné experiment zopakovat s použitím jiného vektoru (právě probíhá).

5.1.2 Reakce na salinitu a sucho

Vzhledem k hypotéze, že by se KUP5 transportér mohl podílet na regulaci turgoru podobně jako transportéry KUP2,6,8 jsem testovala citlivost *kup5* mutantních rostlin k stresovým faktorům zasolení a sucha. Trojití mutanti *kup2,6,8* se v citlivosti k těmto faktorům odlišují od rostlin divokého typu (Osakabe et al. 2013), u *kup5* mutantních rostlin toto zatím nikdy testováno nebylo.

Zvýšená salinita prostředí ovlivňuje růst kořenů a může vyvolat zastavení růstu vzniklých laterálních kořenů (Duan et al. 2013). U trojitých mutantů *kup2,6,8* byla pozorována zvýšená tolerance kořenového systému k salinitě (100mM NaCl v médiu) i osmotickému stresu (200mM manitol) ve srovnání s rostlinami divokého typu (Osakabe et al. 2013). Rostliny se obecně v citlivosti k salinitě velmi liší, rozdíly najdeme i mezi jednotlivými ekotypy *Arabidopsis thaliana* (Julkowska et al. 2014). Pro ekotyp Col-0 existují experimenty dokumentující reakci na různou koncentraci NaCl v médiu. Například v experimentech, které provedla Julkowska (2014) se svým týmem, byl ekotyp Col-0 pěstován na médiích s různou koncentrací NaCl v rozmezí 0 – 150 mM. V případě koncentrace 25 mM NaCl nebyly rozdíly oproti rostlinám na médiu bez NaCl pouhým okem příliš patrné. Při koncentraci 50 mM NaCl byly rostliny stresované v menší míře, rozdíly oproti kontrolní variantě byly však jasně

zřetelné. S vyššími koncentracemi se míra stresu u rostlin silně prohlubovala a při koncentraci 150 mM NaCl byl růst kořenů téměř úplně inhibován.

Pro své experimenty jsem proto zvolila koncentraci 50 mM NaCl, při které jsou rozdíly v růstu kořenového systému již pozorovatelné, ale zároveň není růst kořenového systému extrémně inhibován. Vzhledem k tomu, že v mých experimentech šlo také o vystavení rostlin stresu z nízkého obsahu K^+ , zvolila jsem nepříliš vysokou koncentraci NaCl, aby rostliny v kombinaci těchto variant nebyly příliš stresované a jejich růstové parametry byly měřitelné.

V mých experimentech bylo pozorovatelné snížení produkce biomasy i délky kořenového systému ve variantách s 50 mM NaCl oproti médiu bez NaCl. Inhibován byl především růst kořenového systému, u nadzemních částí nebylo snížení produkce biomasy tak výrazné. Ve většině parametrů byla produkce biomasy a délek kořenového systému opět větší u *kup5* mutantních rostlin oproti rostlinám divokého typu, podobně jako ve variantách bez přidaného NaCl, kde byl pozorován stejný trend. Nelze tak tedy nalézt specifickou odpověď mutantních rostlin *kup5* na zvýšenou salinitu, není patrná zvýšená ani snížená tolerance.

Varianty s vyšším obsahem agaru v médiu měly navodit podmínky suššího a pevnějšího média. Zvolila jsem zvýšení z 1 % na 1,5 %, ale zařadila jsem je pouze jednou (v experimentu 1), protože zde nebyly pozorovatelné výrazné rozdíly v růstu rostlin oproti kontrolnímu médiu. Tato pozorování jsem do své práce chtěla zařadit, protože mutanti *kup2,6,8*, kteří jsou v růstovém fenotypu podobní *kup5* mutantním rostlinám, jsou citliví k suchu. Pro další testování vlivu stresového faktoru sucha by bylo vhodnější rostliny pěstovat *ex vitro* a sucho indukovat reálnou situací (omezením zálivky). Tyto experimenty již ve své diplomové práci realizuje Bc. Barbora Čabelková.

5.2 Lokalizace transportéru KUP5

Dle pozorovaných výsledků mých experimentů rostliny nesoucí konstrukt *35S::KUP5::GFP* v *rdr6* mutantním pozadí vykazují podobný fenotyp, jako mutantní rostliny *kup5*. Je zde tedy určitá pravděpodobnost, že transportér s GFP na C konci není plně funkční nebo není správně regulován. Může zde vznikat kompetice mezi funkčním nativním transportérem a vloženým transportérem s GFP. S tím koresponduje i skutečnost, že mutantní fenotyp vykazovala pouze linie s nejvýraznějším fluorescenčním signálem GFP, ostatní linie rostly srovnatelně jako netransformované *rdr6* rostliny. Je ale také možné, že transportér je funkční, avšak je ho příliš velké množství, což narušuje transport v buňce a výsledkem je pozorovaný mutantní fenotyp.

Tento mutantní fenotyp jsem nepozorovala u rostlin nesoucích konstrukt *pKUP5::KUP5:GFP* v Col-0 pozadí (nebylo detailně hodnoceno).

Pozorovaná lokalizace KUP5:GFP u rostlin nesoucích konstrukt *pKUP5::KUP5:GFP* je v endoplazmatickém retikulu, což nepotvrzuje hypotézu o roli KUP5 v regulaci turgoru transportem K^+ přes plazmatickou membránu nebo tonoplast. Je možné, že pokud konstrukt nefunguje správně, tak mohla být cílová lokalizace v jiné části buňky. Konstrukt však může být funkční, protože např. transportér KUP9 má popsanou lokalizaci v endoplazmatickém retikulu a uvažuje se o jeho roli v transportu K^+ a auxinu mezi ER a cytoplazmou. Zvolili jsme konstrukt s GFP na C konci, protože na N-terminálním konci je u KUP5 popsána lokalizace AC domény, která má regulační schopnost a bez této domény nefunguje transportér správně. I v jiných případech byl použit konstrukt s GFP na C konci, např. při charakterizaci lokalizace transportéru HAK5, nebo KUP7. Transportéry HAK5 i KUP7 jsou lokalizovány na PM, což bylo pomocí těchto konstruktů popsáno (Qi et al. 2008, Han et al. 2016). Bude přesto nutné ověřit funkčnost KUP5-GFP, např. jeho vnesením do *kup5* mutantních rostlin a zhodnocením fenotypu takto transformovaných rostlin.

V případě transportéru HAK5 bylo navíc popsáno, že se lokalizace může měnit s dostupností K^+ v prostředí. Na PM je lokalizován pouze při nízkém obsahu K^+ v prostředí, zatímco jinak je také lokalizovaný v ER a na membráně vakuoly (Qi et al. 2008). Tato translokace byla popsána i u transportérů boru, kdy při nízkém obsahu boru je transportér borátového aniontu BOR1 (high-boron requiring) lokalizovaný na PM, zatímco při vyšším obsahu boru je transportován do endosomů a degradován ve vakuole (Takano et al. 2008). Je tedy možné, že i transportér KUP5 mění lokalizaci v závislosti na dostupnosti K^+ . Byla provedena první pozorování *pKUP5::KUP5:GFP* rostlin stresovaných deficiencí K^+ , kde byl signál GFP uvnitř buněk skutečně výrazně slabší oproti rostlinám na médiu s plným obsahem K^+ . U rostlin vystavených nízké dostupnosti K^+ se však projevuje výraznější autofluorescence buněčných stěn a případnou lokalizaci na plazmatické membráně je obtížné jednoznačně pozorovat i při použití barvení membrány barvivem FM4-64. Je obtížnější oddělit tyto signály a bude potřeba další detailnější pozorování.

6 Závěr

V diplomové práci jsem se věnovala charakterizaci role transportéru KUP5 v rostlině pomocí analýzy růstu T-DNA inzerčního *kup5* mutanta v různých podmínkách prostředí a snažila se lokalizovat expresi KUP5 v rostlině a lokalizaci proteinu KUP5 v buňce. *Kup5* mutantní rostliny se napříč zvolenými kultivačními podmínkami jevíly větší oproti rostlinám kontrolního typu. Původní hypotéza o možné funkci KUP5 byla na základě tohoto růstového fenotypu taková, že se transportér KUP5 podílí na regulaci turgoru, např. že zprostředkovává výdej K^+ z buňky. Tato hypotéza byla vyslovena na základě podobnosti růstu *kup5* mutantní rostliny a trojitého mutanta *kup2,6,8*, který vykazuje větší produkci biomasy, což je způsobeno větším objemovým růstem jeho buněk (Osakabe et al. 2013).

Podařilo se mi zjistit, že *kup5* mutantní rostliny nevykazují odlišnou citlivost k deficienci K^+ , zvýšené salinitě nebo suchu a nevykazují defekty v růstu kořenových vlásků ve srovnání s rostlinami divokého typu. Dále se mi podařilo lokalizovat pomocí konstruktů *pKUP5::KUP5:GFP* transportér KUP5 v endoplazmatickém retikulu při kontrolních podmínkách draslíkové výživy. Tuto lokalizaci bude třeba dále ověřit v rozdílných podmínkách dostupnosti K^+ a zřejmě i s využitím konstruktů nesoucího GFP v jiné části molekuly. V K^+ deficientních podmínkách se signál KUP5:GFP uvnitř buněk zdál podle prvotních pozorování slabší, avšak případnou lokalizaci transportéru na plazmatické membráně je nutné ověřit dalšími pozorováními a minimalizovat autofluorescenční signál. Bude také třeba vnést *pKUP5::KUP5:GFP* do *kup5* mutantních rostlin, což zatím nebylo provedeno.

Na základě těchto zjištění se mi zdá, že funkce KUP5 bude zřejmě jiná, než byla původní hypotéza a projevený fenotyp bude způsobený jinou rolí KUP5 než přímo ve výdeji K^+ z buňky a přímým podílem na regulaci turgoru. S tím by mohly korespondovat i pilotní měření velikosti buněk v kořenech u *kup5* mutantních rostlin, které nejevily větší velikost oproti buňkám u rostlin divokého typu. Tento experiment je však třeba opakovat a bylo by potřeba ověřit velikost buněk nejen v kořenech, ale také v nadzemní části.

Na základě získaných dat, dosavadních pozorování a dosud publikovaných článků není tedy pravděpodobná funkce KUP5 ve výdeji K^+ z buňky, ale nezdá se ani zapojen do příjmu K^+ z prostředí při jeho nedostatku. Lze uvažovat nad zapojením tohoto transportéru do auxinové homeostáze (analogie s transportérem KUP9) nebo regulace K^+ transportu či jiných buněčných procesů prostřednictvím AC aktivity.

7 Seznam použité literatury

- Ahn, S. J., R. Shin, and D. P. Schachtman. 2004. Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiology* 134:1135–1145.
- Al-Abbas, A. H., R. Barr, J. D. Hall, P. L. Crane, and M. F. Baumgardner. 1972. Spectra of normal and nutrient-deficient maize. LARS Technical Reports 128:1–7.
- Al-Younis, I., A. Wong, and C. Gehring. 2015. The Arabidopsis thaliana K⁺-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre. *FEBS Letters* 589:3848–3852.
- Al-Younis, I., A. Wong, F. Lemtiri-Chlieh, S. Schmöckel, M. Tester, C. Gehring, and L. Donaldson. 2018. The arabidopsis thaliana K⁺ -uptake permease 5 (AtKUP5) contains a functional cytosolic adenylate cyclase essential for K⁺ transport. *Frontiers in Plant Science* 871:1–15.
- Araya, T., K. Noguchi, and I. Terashima. 2006. Effects of carbohydrate accumulation on photosynthesis differ between sink and source leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Cell Physiology* 47:644–652.
- Battie-Laclau, P., J. P. Laclau, C. Beri, L. Mietton, M. R. A. Muniz, B. C. Arenque, M. De Cassia Piccolo, L. Jordan-Meille, J. P. Bouillet, and Y. Nouvellon. 2014. Photosynthetic and anatomical responses of *Eucalyptus grandis* leaves to potassium and sodium supply in a field experiment. *Plant, Cell and Environment* 37:70–81.
- Becker, D., D. Geiger, M. Dunkel, A. Roller, A. Bertl, A. Latz, A. Carpaneto, P. Dietrich, M. R. G. Roelfsema, C. Voelker, D. Schmidt, B. Mueller-Roeber, K. Czempinski, and R. Hedrich. 2004. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15621–15626.
- Becker, D., S. Hoth, P. Ache, S. Wenkel, M. R. G. Roelfsema, O. Meyerhoff, W. Hartung, and R. Hedrich. 2003. Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS Letters* 554:119–126.
- Boccarda, M., A. Sarazin, O. Thiébeauld, F. Jay, O. Voinnet, L. Navarro, and V. Colot. 2014. The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes. *PLOS Pathogens* 10:1–16.
- Brady, N. C., and R. R. Weil. 2002. *The Nature and Properties of Soils* (13th Ed.). Pearson Education, Inc., USA.

- Cakmak, I. 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168:521–530.
- Chanroj, S., S. Padmanaban, D. D. Czerny, G. Y. Jauh, and H. Sze. 2013. K⁺ transporter AtCHX17 with its hydrophilic C tail localizes to membranes of the secretory/endocytic system: Role in reproduction and seed set. *Molecular Plant* 6:1226–1246.
- Chen, G., H. Feng, Q. Hu, H. Qu, A. Chen, L. Yu, and G. Xu. 2015a. Improving rice tolerance to potassium deficiency by enhancing OsHAK16p: WOX11-controlled root development. *Plant Biotechnology Journal* 13:833–848.
- Chen, G., Q. Hu, L. Luo, T. Yang, S. Zhang, Y. Hu, L. Yu, and G. Xu. 2015b. Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell and Environment* 38:2747–2765.
- Cooke, G. W., E. S. Carter, U. Bracco, V. Wenner, P. Würsch, K. Mengel, and J. Barber. 1977. Fertilizer use and production of carbohydrates and lipids. Page Proceedings of the 13th Colloquium of the International Potash Institute.
- Czempinski, K., J. M. Frachisse, C. Maurel, H. Barbier-Brygoo, and B. Mueller-Roeber. 2002. Vacuolar membrane localization of the arabidopsis “two-pore” K⁺ channel KCO1. *Plant Journal* 29:809–820.
- Daras, G., S. Rigas, D. Tsitsekian, T. A. Iacovides, and P. Hatzopoulos. 2015. Potassium transporter TRH1 subunits assemble regulating root-hair elongation autonomously from the cell fate determination pathway. *Plant Science* 231:131–137.
- Deeken, R., D. Geiger, J. Fromm, O. Koroleva, P. Ache, R. Langenfeld-Heyser, N. Sauer, S. T. May, and R. Hedrich. 2002. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta* 216:334–344.
- Duan, L., D. Dietrich, C. H. Ng, P. M. Yeen Chan, R. Bhalerao, M. J. Bennett, and J. R. Dinneny. 2013. Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* 25:324–341.
- Duby, G., E. Hosy, C. Fizames, C. Alcon, A. Costa, H. Sentenac, and J. B. Thibaud. 2008. AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *Plant Journal* 53:115–123.
- Edwards, K., C. Johnstone, and C. THompson. 1991. A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Research* 19(6):1349.
- Egilla, J. N., F. T. Davies, and M. C. Drew. 2001. Effect of potassium on drought resistance

- of *Hibiscus rosa-sinensis* cv. Leprechaun: Plant growth, leaf macro- and micronutrient content and root longevity. *Plant and Soil* 229:213–224.
- Epstein, E., D. W. Rains, and O. E. Elzam. 1963. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 49:684–692.
- Gaymard, F., G. Pilot, B. Lacombe, D. Bouchez, D. Bruneau, J. Boucherez, N. Michaux-Ferrière, J. B. Thibaud, and H. Sentenac. 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* 94:647–655.
- Geiger, D., D. Becker, D. Vosloh, F. Gambale, K. Palme, M. Rehers, U. Anschuetz, I. Dreyer, J. Kudla, and R. Hedrich. 2009. Heteromeric AtKC1·AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K⁺-limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry* 284:21288–21295.
- Gerardeaux, E., L. Jordan-Meille, J. Constantin, S. Pellerin, and M. Dingkuhn. 2010. Changes in plant morphology and dry matter partitioning caused by potassium deficiency in *Gossypium hirsutum* (L.). *Environmental and Experimental Botany* 67:451–459.
- Gierth, M., and P. Mäser. 2007. Potassium transporters in plants - Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters* 581:2348–2356.
- Gierth, M., P. Mäser, and J. I. Schroeder. 2005. The potassium transporter AtHAK5 functions in K(+) deprivation-induced high-affinity K(+) uptake and AKT1 K(+) channel contribution to K(+) uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant Physiology* 137:1105–1114.
- Gupta, M., X. Qiu, L. Wang, W. Xie, C. Zhang, L. Xiong, X. Lian, and Q. Zhang. 2008. KT/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*). *Molecular Genetics and Genomics* 280:437–452.
- Hafsi, C., A. Debez, and C. Abdelly. 2014. Potassium deficiency in plants: Effects and signaling cascades. *Acta Physiologiae Plantarum* 36:1055–1070.
- Han, M., W. Wu, W. H. Wu, and Y. Wang. 2016. Potassium Transporter KUP7 Is Involved in K⁺ Acquisition and Translocation in Arabidopsis Root under K⁺-Limited Conditions. *Molecular Plant* 9:437–446.
- Hermans, C., J. P. Hammond, P. J. White, and N. Verbruggen. 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* 11:610–617.
- Hirsch, R. E., B. D. Lewis, E. P. Spalding, and M. R. Sussman. 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280:918–921.
- Höhner, R., A. Aboukila, H.-H. Kunz, and K. Venema. 2016. Proton gradients and proton-

- dependent transport processes in the chloroplast. *Frontiers in Plant Science* 7:1–7.
- Horie, T., M. Sugawara, T. Okada, K. Taira, P. Kaothien-Nakayama, M. Katsuhara, A. Shinmyo, and H. Nakayama. 2011. Rice sodium-insensitive potassium transporter, OsHAK5, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111:346–356.
- Hosy, E., A. Vavasseur, K. Mouline, I. Dreyer, F. Gaymard, F. Porée, J. Boucherez, A. Lebaudy, D. Bouchez, A.-A. Very, T. Simonneau, J.-B. Thibaud, and H. Sentenac. 2003. The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:5549–5554.
- Huber, S. C. 1984. Biochemical basis for effects of K-deficiency on assimilate export rate and accumulation of soluble sugars in soybean leaves. *Plant physiology* 76:424–430.
- Jaquinod, M., F. Villiers, S. Kieffer-Jaquinod, V. Hugouvieux, C. Bruley, J. Garin, and J. Bourguignon. 2007. A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Molecular and Cellular Proteomics* 6:394–412.
- Jordan-Meille, L., and S. Pellerin. 2008. Shoot and root growth of hydroponic maize (*Zea mays* L.) as influenced by K deficiency. *Plant and Soil* 304:157–168.
- Julkowska, M. M., H. C. J. Hoefsloot, S. Mol, R. Feron, G. J. De Boer, M. A. Haring, and C. Testerink. 2014. Capturing arabidopsis root architecture dynamics with root-fit reveals diversity in responses to salinity. *Plant Physiology* 166:1387–1402.
- Jung, J.-Y., R. Shin, and D. P. Schachtman. 2009. Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 21:607–621.
- Kellermeier, F., F. Chardon, and A. Amtmann. 2013. Natural variation of Arabidopsis root architecture reveals complementing adaptive strategies to potassium starvation. *Plant Physiology* 161:1421–1432.
- Kim, M. J., S. Ciani, and D. P. Schachtman. 2010. A peroxidase contributes to ros production during Arabidopsis root response to potassium deficiency. *Molecular Plant* 3:420–427.
- Kobayashi, D., N. Uozumi, S. Hisamatsu, and M. Yamagami. 2010. AtKUP/HAK/KT9, a K⁺ Transporter from Arabidopsis thaliana, Mediates Cs⁺ Uptake in Escherichia coli. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74:203–205.
- Kunz, H. H., M. Gierth, A. Herdean, M. Satoh-Cruz, D. M. Kramer, C. Spetea, and J. I. Schroeder. 2014. Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:7480–7485.

- Lagarde, D., M. Basset, M. Lepetit, G. Conejero, F. Gaymard, S. Astruc, and C. Grignon. 1996. Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *The Plant Journal* 9:195–203.
- Lan, W. Z., S. C. Lee, Y. F. Che, Y. Q. Jiang, and S. Luan. 2011. Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions. *Molecular Plant* 4:527–536.
- Lebaudy, A., A. A. Véry, and H. Sentenac. 2007. K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* 581:2357–2366.
- Lu, Z., J. Lu, Y. Pan, P. Lu, X. Li, R. Cong, and T. Ren. 2016. Anatomical variation of mesophyll conductance under potassium deficiency has a vital role in determining leaf photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 39:2428–2439.
- Maathuis, F. J. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12:250–258.
- Maitrejean, M., M. M. Wudick, C. Voelker, B. Prinsi, B. Mueller-Roeber, K. Czempinski, E. Pedrazzini, and A. Vitale. 2011. Assembly and sorting of the tonoplast potassium channel *atpk1* and its turnover by internalization into the vacuole. *Plant Physiology* 156:1783–1796.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Marschner, H., E. a Kirkby, and I. Cakmak. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* 47:1255–1263.
- Miller, E. M., and J. A. Nickoloff. 1995. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Springer.
- Mouline, K., A. Véry, F. Gaymard, J. Boucherez, G. Pilot, M. Devic, D. Bouchez, J. Thibaud, and H. Sentenac. 2002. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in Arabidopsis. *Genes and Development* 16:339–350.
- Neill, S., R. Desikan, and J. Hancock. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388–395.
- Nieves-Cordones, M., R. Ródenas, A. Chavanieu, R. M. Rivero, V. Martinez, I. Gaillard, and F. Rubio. 2016. Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: Species distribution and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 7:1–7.
- O’Toole, J. C., K. Treharne, M. Turnipseed, K. Crookston, and J. Ozburn. 1980. Effect of potassium nutrition on leaf anatomy and net photosynthesis of *Phaseolus Vulgaris* L. *New Phytologist* 84:623–630.
- Okada, T., H. Nakayama, A. Shinmyo, and K. Yoshida. 2008. Expression of OsHAK genes

- encoding potassium ion transporters in rice. *Plant Biotechnology* 25:241–245.
- Osakabe, Y., N. Arinaga, T. Umezawa, S. Katsura, K. Nagamachi, H. Tanaka, H. Ohiraki, K. Yamada, S.-U. Seo, M. Abo, E. Yoshimura, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2013. Osmotic Stress Responses and Plant Growth Controlled by Potassium Transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25:609–624.
- Pettigrew, W. T. 1999. Potassium deficiency increases specific leaf weights and leaf glucose levels in field-grown cotton. *Agronomy Journal* 91:962–968.
- Pettigrew, W. T. 2008. Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. *Physiologia Plantarum* 133:670–681.
- Postma, J. A., and J. P. Lynch. 2011. Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. *Plant Physiology* 156:1190–1201.
- Qi, Z., C. R. Hampton, R. Shin, B. J. Barkla, P. J. White, and D. P. Schachtman. 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, Y. J., W. H. Wu, and Y. Wang. 2019. ZmHAK5 and ZmHAK1 function in K⁺ uptake and distribution in maize under low K⁺ conditions. *Journal of Integrative Plant Biology* 61:691–705.
- Ragel, P., R. Ródenas, E. García-Martín, Z. Andrés, I. Villalta, M. Nieves-Cordonos, R. M. Rivero, V. Martínez, J. M. Pardo, F. J. Quintero, and F. Rubio. 2015. CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K⁺ uptake in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* 169:pp.01401.2015.
- Rigas, S., G. Debrosses, K. Haralampidis, F. Vicente-Agullo, K. a Feldmann, A. Grabov, L. Dolan, and P. Hatzopoulos. 2001. TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *The Plant Cell* 13:139–151.
- Rigas, S., F. A. Ditengou, K. Ljung, G. Daras, O. Tietz, K. Palme, and P. Hatzopoulos. 2013. Root gravitropism and root hair development constitute coupled developmental responses regulated by auxin homeostasis in the *Arabidopsis* root apex. *New Phytologist* 197:1130–1141.
- Rodríguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 1469:1–30.
- Römheld, V., and E. A. Kirkby. 2010. Research on potassium in agriculture: Needs and prospects. *Plant and Soil* 335:155–180.

- Rubio, F., M. Fon, R. Ródenas, M. Nieves-Cordones, F. Alemán, R. M. Rivero, and V. Martínez. 2014. A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiologia Plantarum* 152:558–570.
- Rubio, F., W. Gassmann, and J. Schroeder. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270:1660–1663.
- Santa-maría, G. E., F. Rubio, J. Dubcovsky, A. Rodríguez-navarro, T. P. Cell, and R. Science. 1997. The HAK1 Gene of Barley 1. *Gene* 9:2281–2289.
- Sardans, J., and J. Penuelas. 2015. Potassium: A neglected nutrient in global change. *Global Ecology and Biogeography* 24:261–275.
- Scherzer, S., J. Böhm, E. Krol, L. Shabala, I. Kreuzer, C. Larisch, F. Bemm, K. A. S. Al-Rasheid, S. Shabala, H. Rennenberg, E. Neher, and R. Hedrich. 2015. Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:7309–7314.
- Scholl, R. L., S. T. May, and D. H. Ware. 2000. Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1477–1480.
- Schroeder JI, Ward JM, G. W. 1994. Perspective on the physiology and structure of inward -rectifying K⁺ channels in higher plants: Biophysical Implications for K⁺ Uptake. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure* 23:442–471.
- Sentenac, H., N. Bonneaud, M. Minet, F. Lacroute, J. Salmon, F. Gaymard, and C. Grignon. 1992. Cloning and Expression in Yeast of a Plant Potassium Ion Transport System. *Science* 256:663–665.
- Sharma, T., I. Dreyer, and J. Riedelsberger. 2013. The role of K⁽⁺⁾ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 4:1–16.
- Shen, Y., L. Shen, Z. Shen, W. Jing, H. Ge, J. Zhao, and W. Zhang. 2015. The potassium transporter OsHAK21 functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant Cell and Environment* 38:2766–2779.
- Shin, R., and D. P. Schachtman. 2004. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:8827–8832.
- Soukup, A., and E. Tylová. 2019. Essential Methods of Plant Sample Preparation for Light Microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1992:1–26.
- Šustr, M. 2015. Zapojení přenašečů AtKT/HAK/KUP do příjmu K⁺ a Cs⁺ rostlinami. Univerzita Karlova, Praha.

- Takano, J., K. Miwa, and T. Fujiwara. 2008. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in Plant Science* 13:451–457.
- Vicente-Agullo, F., S. Rigas, G. Desbrosses, L. Dolan, P. Hatzopoulos, and A. Grabov. 2004. Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots. *The Plant Journal* 40:523–535.
- Voelker, C., J. L. Gomez-Porrás, D. Becker, S. Hamamoto, N. Uozumi, F. Gambale, B. Mueller-Roeber, K. Czempinski, and I. Dreyer. 2010. Roles of tandem-pore K⁺ channels in plants - a puzzle still to be solved. *Plant Biology* 12:56–63.
- Walker, D. J., R. Leigh, and J. Miller. 1996. Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:10510–10514.
- Wang, Y., and W.-H. Wu. 2013. Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:451–476.
- Wang, Y., and W. H. Wu. 2015. Genetic approaches for improvement of the crop potassium acquisition and utilization efficiency. *Current Opinion in Plant Biology* 25:46–52.
- Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G. V. Wilson, and N. J. Provart. 2007. An “electronic fluorescent pictograph” Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2:1–12.
- Xu, J., H. D. Li, L. Q. Chen, Y. Wang, L. L. Liu, L. He, and W. H. Wu. 2006. A Protein Kinase, Interacting with Two Calcineurin B-like Proteins, Regulates K⁺ Transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125:1347–1360.
- Yang, T., S. Zhang, Y. Hu, F. Wu, Q. Hu, G. Chen, J. Cai, T. Wu, N. Moran, L. Yu, and G. Xu. 2014. The role of a potassium transporter oshak5 in potassium acquisition and transport from roots to shoots in rice at low potassium supply levels. *Plant Physiology* 166:945–959.
- Zanetti, M., E. Teardo, N. La Rocca, L. Zulkifli, V. Checchetto, T. Shijuku, Y. Sato, G. M. Giacometti, N. Uozumi, E. Bergantino, and I. Szabo. 2010. A novel potassium channel in photosynthetic cyanobacteria. *PLoS ONE* 5.
- Zhang, H., W. Xiao, W. Yu, L. Yao, L. Li, J. Wei, and R. Li. 2018. Foxtail millet SiHAK1 excites extreme high-affinity K⁺ uptake to maintain K⁺ homeostasis under low K⁺ or salt stress. *Plant Cell Reports* 37:1533–1546.
- Zhang, M., P. Huang, Y. Ji, S. Wang, S. Wang, Z. Li, Y. Guo, Z. Ding, W. Wu, and Y. Wang. 2020. KUP 9 maintains root meristem activity by regulating K⁺ and auxin homeostasis in response to low K. *EMBO reports* e50164:1–20.

- Zhao, D., D. M. Oosterhuis, and C. W. Bednarz. 2001. Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica* 39:103–109.
- Zhao, Y., Y. Hu, M. Dai, L. Huang, and D. X. Zhou. 2009. The WUSCHEL-Related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell* 21:736–748.
- Zörb, C., M. Senbayram, and E. Peiter. 2014. Potassium in agriculture - Status and perspectives. *Journal of Plant Physiology* 171:656–669.