

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Marek Šustr

Diplomová práce

Zapojení přenašečů AtKT/HAK/KUP do příjmu K^+ a Cs^+ rostlinami

Involvement of AtKT/HAK/KUP high-affinity transporters in plant K^+ and Cs^+ uptake

Školitel: RNDr. Edita Tylová, Ph.D
Konzultant: doc. RNDr. Jan Pokorný, CSc.

Praha, 2015

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, 13. 8. 2015

Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své školitelce RNDr. Editě Tylové Ph.D za podnětné a velmi příjemné školení, dále bych chtěl poděkovat ing. Yvettě Šefrnové, za její pomoc praktickou i teoretickou, Šárce Benešové, Tereze Šnajdrové a Zuzaně Blascheové za to že jsme tvořili soudržný a veselý laboratorní kolektiv, RNDr. Aleši Soukupovi Ph.D, Mgr Ivanu Kulichovi Ph.D a RNDr. Michalu Hálovi Ph.D za neocenitelné rady při transformaci rostlin a také všem dalším pracovníkům katedry za to, že spoluvytvářejí příjemné místo k práci. Dále bych chtěl poděkovat ing. Tereze Ježkové a ing. Petru Rulíkovi ze Státního ústavu radiační ochrany za spolupráci na experimentu akumulace ¹³⁴Cs.

Chtěl bych poděkovat své rodině za její podporu psychickou i materiální po dobu studia a především za to, že 100 km na sever se nachází místo, kterému říkám doma.

Dále bych chtěl poděkovat svým přátelům a kamarádům za to, že jsou, a především za to, že jsou takoví, jací jsou.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rostlinám za to, že nezištně produkují potravu a ochlazují své okolí, a za to, že jsou zelené, neprojevují city, nezapáchají a nehýbou se, což z nich dělá ideální modelové organizmy.

Abstrakt.....	8
Abstract.....	9
Seznam zkratek.....	10
1 Úvod.....	12
1.1 Cíle práce.....	12
2 Přehled literatury.....	14
2.1 Příjem K ⁺	14
2.1.1 KT/HAK/KUP transportéry.....	15
2.1.2 KEA transportéry.....	23
2.1.3 CHX transportéry.....	23
2.1.4 Shaker-like kanály.....	23
2.1.5 Souhra transportních systémů.....	25
2.2 Příjem Cs ⁺ rostlinami.....	26
2.2.1 Mechanismus příjmu Cs ⁺	27
3 Metodika.....	28
3.1 Biologický materiál a kultivační podmínky.....	28
3.1.1 Rostlinný materiál.....	28
3.1.2 Bakteriální kmeny.....	28
3.2 Práce s DNA.....	29
3.2.1 Izolace DNA pro genotypování.....	29
3.2.2 Izolace DNA pro klonování.....	29
3.2.3 Polymerázová řetězcová reakce pro genotypování.....	30
3.2.4 Polymerázová řetězcová reakce z bakteriálních kolonií.....	31
3.2.5 Amplifikace promotorové sekvence.....	32
3.2.6 Agarózová gelová elektroforéza.....	32
3.2.7 Měření koncentrace DNA.....	33
3.2.8 Restrikční reakce.....	33
3.2.9 Elektroporace.....	33
3.3 Linie Arabidopsis thaliana.....	34
3.3.1 Kontrolní genotyp.....	35
3.4 Kultivace rostlin <i>in vitro</i>	35
3.4.1 Příprava Petriho misek s médii.....	36
3.5 Měření růstových parametrů rostlin.....	37
3.6 Mikroskopická analýza meristémů kořenů <i>kup9</i>	37
3.7 Odolnost rostlin k suchu.....	38
3.8 Akumulace radioizotopu ¹³⁴ Cs.....	39

3.8.1 Zhotovení nosníků.....	39
3.8.2 Předpěstování rostlin.....	40
3.8.3 Kultivace se ¹³⁴ Cs a měření aktivity.....	41
3.9 Křížení linií.....	42
3.10 Transformace <i>A. thaliana</i> konstruktem KUP9::GUS.....	43
3.10.1 Plazmidy.....	43
3.10.2 Postup práce.....	44
3.11 Statistické zpracování výsledků.....	47
4 Výsledky.....	48
4.1 Ověření homozygotních inzerčních mutantů.....	48
4.2 Růstové parametry T-DNA inzerčních linií.....	49
4.2.1 Kultivace 1: Vliv K ⁺ a NH ₄ ⁺	49
4.2.2 Kultivace 2: vliv K ⁺ při absenci NH ₄ ⁺	57
4.2.3 Kultivace 3: vliv K ⁺ při absenci NH ₄ ⁺ na vybrané linii.....	59
4.2.4 Kultivace 4: ověření fenotypu kup9-1 pomocí kup9-2.....	62
4.3 Mikroskopická analýza meristémů kořenů <i>kup9</i>	64
4.4 Odolnost rostlin k suchu.....	66
4.5 Akumulace radioizotopu ¹³⁴ Cs.....	68
4.6 Křížení linií.....	69
4.7 Transformace <i>A. thaliana</i> konstruktem KUP9::GUS.....	70
5 Diskuze.....	71
5.1 Růstové parametry T-DNA inzerčních linií.....	71
5.1.1 Kultivační média.....	71
5.1.2 Vliv dostupnosti K ⁺	72
5.1.3 Vliv přídatku NH ₄ ⁺	73
5.1.4 Fenotyp <i>kup9</i>	74
5.2 Odolnost rostlin k suchu.....	76
5.4 Akumulace ¹³⁴ Cs.....	78
5.5 Transformace <i>Arabidopsis</i> konstruktem pKUP9::GUS.....	79
6 Závěr.....	80
7 Použitá literatura.....	81

Abstrakt

Draslík je esenciální biogenní prvek a je přijímán rostlinami ve velkém množství, protože v nich plní úlohu hlavního osmotika rostlinné buňky. Vzhledem k výrazně odlišné dostupnosti draslíku v různých půdách vyvinuly rostliny systém přenašečů, který zabezpečuje dostatečný příjem K^+ v rozmezí několika řádů jeho externí koncentrace. Mechanismus příjmu K^+ je u *Arabidopsis thaliana* dobře prozkoumán a je známo, že při jeho velmi nízkých koncentracích je do příjmu zapojen především transportér AtHAK5, který patří do rodiny přenašečů KT/HAK/KUP. Tato rodina má v *A. thaliana* 13 členů, a pro některé z nich jsou známy funkce například v transportu auxinu v kořenové špičce (TRH1), nebo v pohybech prùduchů (KUP6).

V této práci bylo zkoumáno možné zapojení doposud nestudovaných transportérů KUP5, KUP7, KUP9 a KUP10 do příjmu a homeostáze K^+ v *A. thaliana*. V *in vitro* kultivacích bylo zjištěno, že mutant *kup9* vyvíjí pouze velmi krátké postranní kořeny při nedostatku K^+ , oproti tomu mutant *kup5* měl při nedostatku K^+ signifikantně větší suchou hmotnost než Col-0. Fenotyp *kup9* se podařilo potvrdit v dalších kultivacích a následně byla zkoumána anatomie apikálních meristémů postranních kořenů *kup9*. Kořenové špičky *kup9* byly při nedostatku K^+ odlišně uspořádané a jevíly známky dřívější terminace meristémů. Za účelem lokalizovat expresi *KUP9* byly rostliny *A. thaliana* transformovány konstruktem pKUP9::GUS avšak, z časových důvodů nebylo možno výsledky vyhodnotit.

Když byly rostliny vystaveny stresu suchem, měly všechny testované linie snížený relativní obsah vody v prýtu a navíc mutanty *kup9* měly sníženou suchou i čerstvou hmotnost. Tyto výsledky by mohli ukazovat na nezanedbatelnou funkci všech studovaných transportérů v K^+ homeostáze avšak musí být ještě prověřeny.

Při inkubaci rostlin s radioizotopem ^{134}Cs měly mutanty *kup7* sníženou akumulaci Cs^+ v kořenech, což může poukazovat na zapojení KUP7 do příjmu K^+ . Navíc byl v této kultivaci zkoumán i mutant *hak5*, jenž rovněž hůře akumuloval Cs^+ v kořenech. Pokud by se tento výsledek podařilo zopakovat, jednalo by se o definitivní potvrzení zásadního zapojení tohoto transportéru do příjmu Cs^+ z prostředí.

Klíčová slova: Cesium, draslík, KT/HAK/KUP, postranní kořeny, příjem

Abstract

Potassium is essential macroelement and large amount of potassium is taken up by plants, because it's the major osmotic of plant cell. Due to various potassium availability in different kinds of soil, plants have evolved transport system that can maintain sufficient K^+ uptake between several orders of magnitude of potassium concentration. In *Arabidopsis thaliana* mechanism of K^+ acquisition is well understood and it's known that AtHAK5 is mainly involved in K^+ uptake in its very low concentrations. AtHAK5 belongs to KT/HAK/KUP family that consist 13 members in *A. thaliana*. There's known function for some members for example in auxin transport in root tip (TRH1) or in K^+ efflux in stomatal closure (KUP6).

In this thesis possible involvement of yet unstudied transporters KUP5, KUP7, KUP9 and KUP10 in K^+ acquisition and homeostasis in *A. thaliana* was investigated. *In vitro* cultivation showed that *kup9* mutant has very short lateral roots in K^+ deficiency. On the other hand *kup5* mutant showed significantly higher dry weight in K^+ deficiency than Col-0. *Kup9* phenotype was successfully replicated in subsequent cultivations and anatomy of lateral root apical meristems was investigated. Root tips of *kup9* were differently organized in K^+ deficiency and they showed signs of early termination of meristems. To localize the expression of *KUP9* plants of *A. thaliana* were transformed with pKUP9::GUS construct, although it wasn't possible to evaluate the results yet.

When the plants were exposed to draught all lines showed decrease in relative water content of shoot moreover *kup9* had lower dry weight and fresh weight. These results may suggest that all transporters have function in K^+ homeostasis, although these results has to be checked deeper.

When cultivated with ^{134}Cs radioisotope *kup7* mutants showed reduced Cs^+ accumulation in roots, this may suggest that KUP7 is involved in K^+ uptake. In addition *hak5* mutant was studied and it also accumulated less Cs^+ in roots. If this result could be replicated it will be the final evidence of relevant involvement of HAK5 in cesium uptake from environment.

Key words: Cesium, KT/HAK/KUP, lateral roots, potassium, uptake

Seznam zkratek

ABA	Kyselina abscisová
AKT1	<i>Arabidopsis</i> K ⁺ transporter 1
CBL	Calcinuerin B-like
CIPK	CBL interacting protein kinase
CNGC	cyclic nucleotide gated channels
Col-0	Columbia-0
CTAB	Cetyltrimetylamoniumbromid
DIC	Diferenciální interferenční kontrast
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMSO	Dimetylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidy
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ER	Endoplazmatické retikulum
GFP	(<i>Green fluorescent protein</i>) Zelený fluorescenční protein
GORK	Guard cell outward rectifying K ⁺
GUS	β-glukuronidáza
HAK	High-affinity K ⁺
HATS	(<i>High-affinity transport system</i>) Vysokoafinitní transportní systém
CHX	Cation/H ⁺ exchanger
KAT1	K ⁺ <i>Arabidopsis</i> transporter 1
KC1	K ⁺ channel 1
KEA	K ⁺ efflux antiporters
KT/HAK/KUP	K ⁺ transport/high-affinity K ⁺ /K ⁺ uptake protein
KUP	K ⁺ uptake protein
LATS	(<i>Low-affinity transport system</i>) Nízkoafinitní transportní systém
NEB	New England Biolabs
PCR	(<i>Polymerase chain reaction</i>) Polymerázová řetězcová reakce
PVP	Polyvinylpyrolidon
R/S	(<i>Root/shoot</i>) Kořen/prýt
RFP	(<i>Red fluorescent protein</i>) Červený fluorescenční protein
ROS	(<i>Reactive oxygen species</i>) Reaktivní formy kyslíku

SDS	<i>(Sodium dodecyl sulfate)</i> Dodecylsírán sodný
SHY3	Short hypocotyl 3
SKOR	Shaker-like K ⁺ outward rectifying
SÚRO	Státní ústav radiální ochrany
T-DNA	Transformační deoxyribonukleová kyselina
TEA	Tetraethylamonium
TRH1	Tiny root hair 1
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometan
WHO	<i>(World Health Organisation)</i> Světová zdravotnická organizace
WT	<i>(Wild type)</i> Přirozený genotyp
YFP	<i>(Yellow fluorescent protein)</i> Žlutý fluorescenční protein

1 Úvod

Rostliny se musí vypořádat s proměnlivými podmínkami různých stanovišť a jednou z výzev, kterým čelí, je získat optimální množství všech esenciálních minerálních živin, při jejich velmi rozdílné dostupnosti v půdě. Draslík není v tomto ohledu výjimkou. Ačkoli je draslík čtvrtým nejzastoupenějším prvkem v litosféře, jeho koncentrace v půdách je velmi proměnlivá a vzhledem k tomu, že může být účinně imobilizován jílovými minerály, může se K^+ stát limitující živinou. Jeho důležitost spočívá ve funkci hlavního osmotika rostlinné buňky, jeho koncentrace v cytoplazmě je udržována na hodnotě zhruba 100 mM. V této roli tedy K^+ řídí objemový růst každé buňky v rostlině, navíc se účastní tak zásadního děje pro přežití rostliny, jakým jsou pohyby průduchů. K^+ homeostáza je rovněž důležitá pro aktivitu enzymů včetně fotosyntetických.

Příjem K^+ je bifázický a v závislosti na vnější koncentraci K^+ jsou do něj zapojeny přenašeče s různou afinitou pro K^+ (Epstein et al., 1963). Při koncentracích nad 0,1 mM je příjem pasivní a je zajišťován především kanály. Při koncentracích nižších dochází k expresi vysokoafinitních transportérů, které zprostředkovávají sekundárně aktivní příjem K^+ (Maathuis a Sanders, 1994, Ahn et al., 2004). Transportéry, které plní tuto úlohu byly u mnoha modelových druhů odhaleny v rodině KT/HAK/KUP (Santa-Maria et al., 1997, Rubio et al., 2000). Největší pozornosti se v současnosti dostává transportéru AtHAK5, u kterého bylo prokázáno, že je téměř výhradně zapojen do vysokoafinitního příjmu *A. thaliana*. Vysokoafinitní transportéry nejsou příliš selektivní pro K^+ a transportují i jeho chemické analogy jako jsou Rb^+ a Cs^+ (Rubio et al., 2008).

Cs^+ se v litosféře vyskytuje jen minimálně a jeho radioizotopy ^{134}Cs a ^{137}Cs jsou produkty štěpení obohaceného uranu a na Zemi se vyskytují až od prvních testů jaderných bomb. V Evropě potom došlo k výrazné kontaminaci při výbuchu jaderné elektrárny v Černobylu. Cs^+ je toxické a možnost fytoremediace zamořených ploch je jednou z možností jeho odstranění, avšak příjem Cs^+ rostlinami ještě není zcela probádanou problematikou ani u intenzívně studovaného huseníčku (*A. thaliana*).

1.1 Cíle práce

Tato práce navazuje na bakalářskou práci o příjmu Cs^+ rostlinami a pokouší se nalézt nové transportéry, zapojené do příjmu či translokace K^+ a Cs^+ v rostlinách *A. thaliana*. Práce si klade za cíl charakterizovat T-DNA inzerční linie KT/HAK/KUP transportérů KUP5, KUP7, KUP9 a KUP10. Tyto transportéry doposud stály mimo zájem vědecké veřejnosti avšak *KUP5* a *KUP9* vykazují slibnou expresi v kořenech (Gierth et al., 2005). Příbuzné transportéry *KUP7* a *KUP10*

jsou rovněž v kořenech exprimovány a bude zkoumáno, zda příbuzné transportéry neplní redundantní funkce.

Cíle pro jednotlivé experimenty byly stanoveny takto:

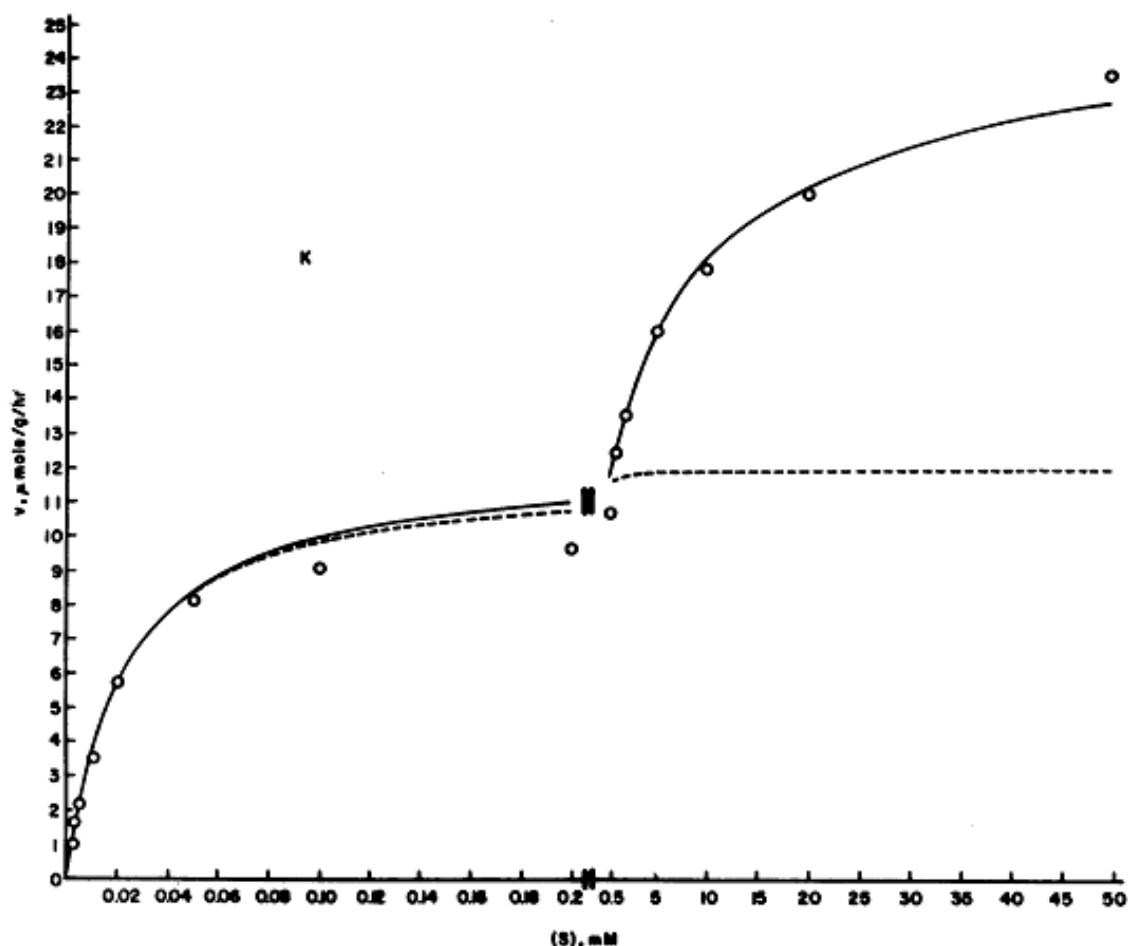
- Charakterizovat růstové vlastnosti a architekturu kořenového systému jednotlivých linií v *in vitro* kulturách v závislosti na dostupnosti K^+ .
- Provéřit odolnost linií ke stresu suchem.
- Provéřit schopnost linií akumulovat ^{134}Cs v hydroponických kulturách.
- Pro vybrané transportéry lokalizovat expresi pomocí transkripčních fúzí.
- Připravit dvojnásobně mutantní homozygotní linie pro příbuzné transportéry.

2 Přehled literatury

2.1 Příjem K^+

Již v pionýrské práci z 60. let bylo prokázáno u ječmene (*Hordeum vulgare*), že K^+ je přijímán rostlinami prostřednictvím bifázického mechanismu (viz obrázek 1, Epstein et al., 1963). Podobné mechanismy byly posléze objeveny u dalších modelových rostlin a na základě odlišné senzitivity k různým látkám bylo přijímáno, že vysokoafinitní a nízkoafinitní systém je zprostředkováván odlišnými přenašeči (Kochian a Lucas, 1982).

Obrázek 1: Závislost rychlosti příjmu K^+ na jeho externí koncentraci (Epstein et al., 1963)



Pro vysokoafinitní systém, obvykle nazývaný HATS (high-affinity transport system) byly publikovány hodnoty $K_M = 10 - 20 \mu\text{M}$, saturace HATS byla zaznamenána mezi 0,1 – 0,4 mM externí koncentrace K^+ (Epstein et al., 1963, Maathuis a Sanders, 1997, Santa-Maria et al., 1997, Martínez-Cordero et al., 2004, Nieves-Cordones et al., 2007). Pro *A. thaliana* byla elektrofyziologickými metodami zkoumána energizace vysokoafinitního transportu, která je pravděpodobně

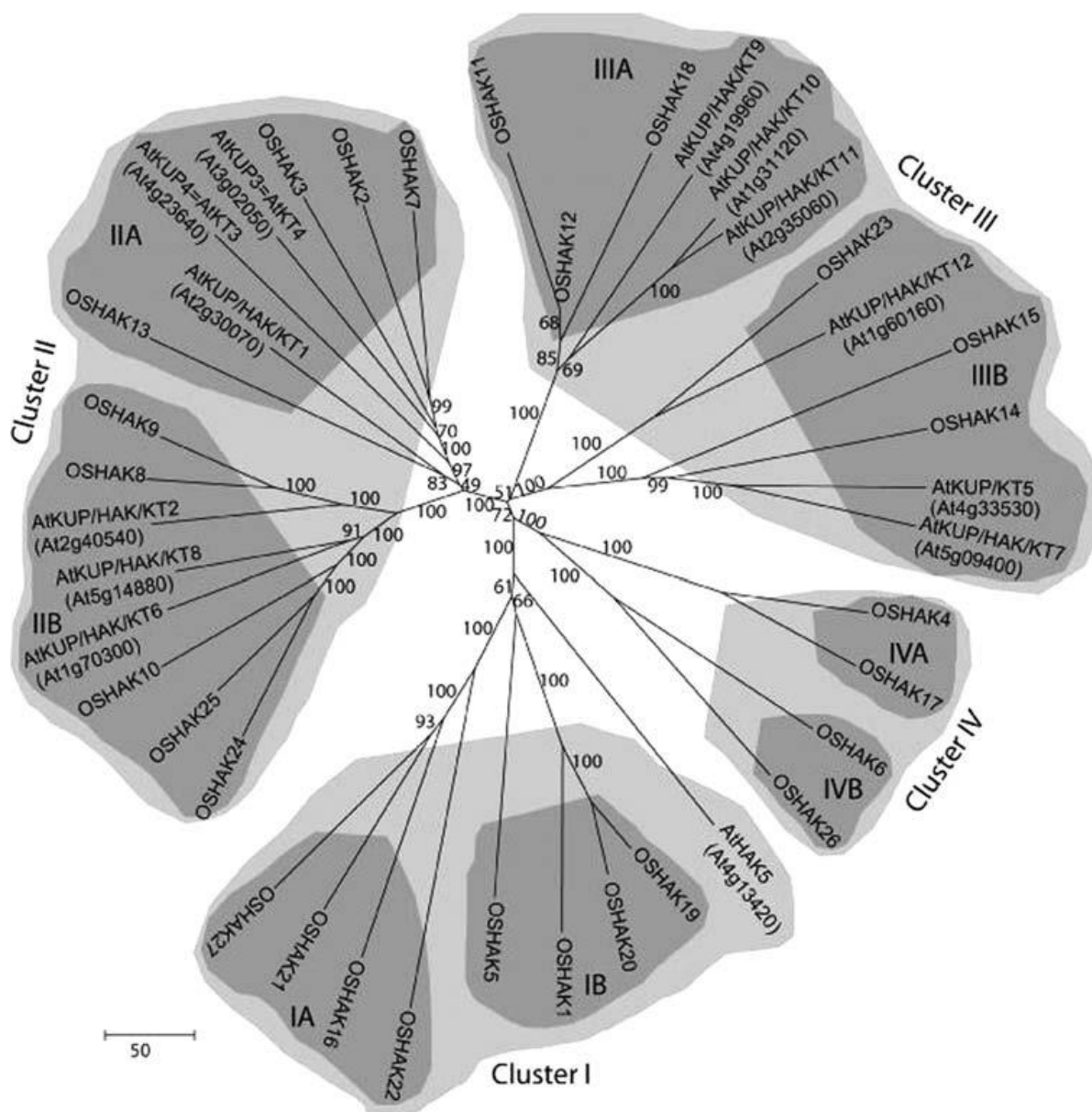
zajišťována symportem s protonem v poměru 1:1 (Maathuis a Sanders, 1994). Na různých modelových rostlinách byla nezávisle objevena senzitivita HATS k NH_4^+ , což vedlo k názoru, že je vysokoafinitní příjem zajišťován příbuznými přenašeči. Posléze byly izolovány sekvence pro KT/HAK/KUP přenašeče, které měly při heterologní expresi v kvasinkách a oocytech *Xenopus laevis* vlastnosti odpovídající HATS daných rostlin (Santa-Maria et al., 1997, Martínez-Cordero et al., 2004, Nieves-Cordones et al., 2007).

Nízkoafinitní systém se zkráceně nazývá LATS (low-affinity transport system). Tento systém funguje za vyšších externích koncentrací K^+ a je umožňován negativním membránovým potenciálem, je tedy energeticky pasivní. Z elektrofyziologických dat byla určena externí koncentrace K^+ , která již umožňuje pasivní příjem na 0,3 mM (Gassmann a Schroeder, 1994). V některých studiích nebyla pozorována saturace LATS, přestože byly zkoumány i velmi vysoké koncentrace K^+ (Kochian a Lucas, 1982). Transport LATS se podařilo inhibovat TEA (tetraethylamonium, Kochian a Lucas, 1982), což je inhibitor živočišných shaker-like kanálů. Další zkoumání LATS bylo tedy zaměřeno na rostlinné homology shaker-like kanálů.

2.1.1 KT/HAK/KUP transportéry

KT/HAK/KUP transportéry byly poprvé objeveny v *E. coli* (Epstein a Kim, 1971). KT/HAK/KUP transportéry se krom toho vyskytují i u *Archea*, hub, a rostlin. Napříč různými modelovými organizmy i jednotlivými pracemi, byly přenašeče nazývány různě, až se ustálila souhrnná zkratka KT (K^+ transport)/HAK (high-affinity K^+)/KUP (K^+ uptake protein). Rostliny jsou jedinou skupinou organismů, kde byly zatím KT/HAK/KUP transportéry nalezeny u všech testovaných druhů (Grabov, 2007). Homologní přenašeče byly izolovány z ječmene (*Hordeum vulgare*, Santa-Maria et al., 1997), Huseníčku (*Arabidopsis thaliana*, Rubio et al., 2000), papriky (*Capsicum annuum*, Martínez-Cordero et al., 2004) a mnoha dalších modelových druhů. KT/HAK/KUP je velmi diverzifikovaná rodina obsahující mnoho přenašečů, doposud bylo v genomických studiích objeveno 13 genů u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*, Rubio et al., 2000), 27 genů u rýže (*Oryza sativa*, Gupta et al., 2008), 31 genů u topolu (*Populus trichocarpa*, Hernandez et al., 2012), 27 genů u kukuřice (*Zea mays*, Zhang et al., 2012) a 19 u rajčete (*Lycopersicon esculentum*, Hyun et al., 2014). Fylogenetické studie rozdělují transportéry KT/HAK/KUP shodně do čtyř klastrů (viz obrázek 2, Gupta et al., 2008, Zhang et al., 2012).

Obrázek 2: Fylogenetický vztah KT/HAK/KUP transportérů *A. thaliana* a *O. sativa* (Gupta et al., 2008)



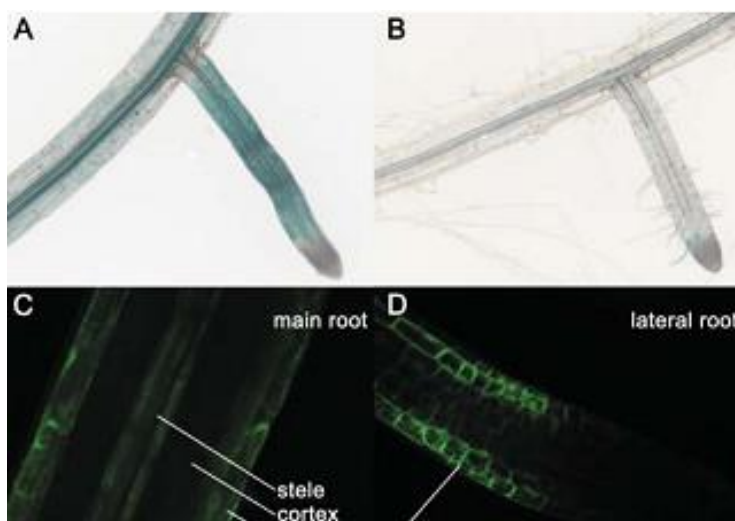
Zapojení KT/HAK/KUP transportérů do příjmu K⁺.

U několika modelových druhů bylo objeveno, že vysokoafinitní transport K⁺ probíhá pouze, pokud je indukován nízkou dostupností K⁺ a je výrazně inhibován přidavkem NH₄⁺. Následně byly u těchto druhů izolovány KT/HAK/KUP transportéry z klastru I, jejichž vlastnosti a expresní vzorec odpovídaly vysokoafinitnímu systému (Santa-María et al., 2000, Martínez-Cordero et al., 2004, Gierth et al., 2005, Qi et al., 2008). Tento koncept dnes převažuje, především díky tomu, že hlavním modelovým organismem je *Arabidopsis thaliana*, ovšem odlišná regulace byla objevena například u halofytních rostlin (Alemán et al., 2009). U rajčete (*Lycopersicon esculentum*) byl

prokázán vliv především membránového potenciálu na expresi *LeHAK5* oproti koncentraci jednotlivých iontů (Nieves-Cordones et al., 2008).

Pro *A. thaliana* bylo prokázáno, že nízká dostupnost K^+ zvyšuje expresi jediného genu více než dvakrát a tímto genem byl *AtHAK5* (Ahn et al., 2004, Gierth et al., 2005). Expresi *AtHAK5* je detekovatelná pouze u rostlin vystavených nízké koncentraci K^+ a to především v rhizodermis hlavního kořene i postranních kořenů. Transportér fúzovaný s GFP byl lokalizován na plazmatické membráně (viz obrázek 3, Gierth et al., 2005). Pro mutanty *athak5* byla naměřena snížená schopnost přijímat K^+ nebo Rb^+ při externích koncentracích až 0,5 mM (Gierth et al., 2005, Rubio et al.,

Obrázek 3: Lokalizace exprese *AtHAK5* (Gierth et al., 2005)



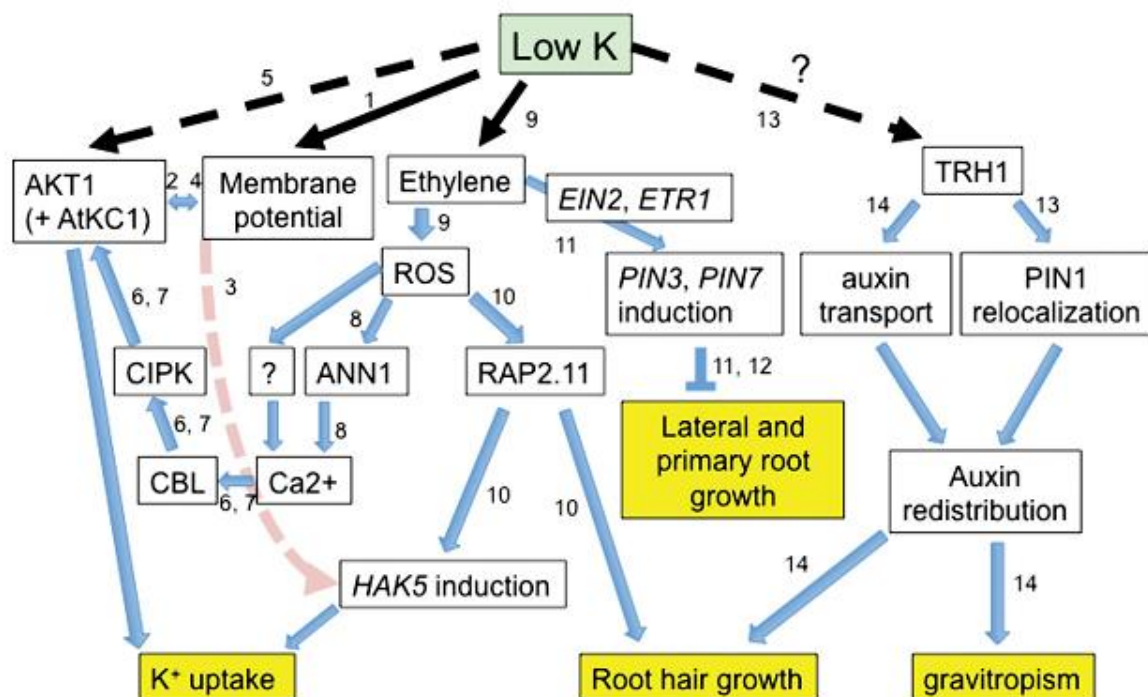
2008, Rubio et al., 2010), avšak obsah K^+ v sušině rostlin *athak5* se nelišil od kontrolních rostlin (Rubio et al., 2008, Rubio et al., 2010). Funkce *AtHAK5* při nízkých koncentracích je redundantní s shaker-like kanálem AKT1, který je aktivní už při $10 \mu M K^+$, proto se inhibice růstu *athak5* oproti kontrole projevuje až okolo $10 \mu M K^+$ v závislosti na kultivačních podmínkách (Qi et al., 2008, Pyo et al., 2010). U rostlin transformovaných *pHAK5::GUS*

aktivita GUS téměř vymizela už při vystavení $0,1 \text{ mM NH}_4^+$, takže u *A. thaliana* nedochází k blokadě vysokoafinitního příjmu K^+ působením NH_4^+ , ale k potlačení exprese jeho komponenty (Qi et al., 2008), což bylo částečně ukázáno i u papriky (*Capsicum annuum*, Martínez-Cordero et al., 2004).

U *A. thaliana* je už po 6 h od omezení dostupnosti K^+ možno detekovat zvýšenou produkci H_2O_2 v oblasti nad elongační zónou. Navíc exogenní H_2O_2 indukuje expresi *HAK5* v rostlinách s dostatkem K^+ (Shin a Schachtman, 2004). Pro rostliny rajčete (*Lycopersicon esculentum*) bylo rovněž prokázáno zvýšení exprese genů účastnících se produkce a detoxifikace H_2O_2 při nedostatku K^+ (Hernandez et al., 2012). Zároveň s produkcí H_2O_2 byla zaznamenána i zvýšená produkce etylénu (Shin a Schachtman, 2004). Studium mutantů v produkci etylénu bylo prokázáno, že etylén spouští produkci H_2O_2 (viz obrázek 4, Jung et al., 2009). Následně byl objeven transkripční faktor RAP2.11, který spouští expresi *AtHAK5* i mnoha dalších genů účastnících se

odpovědi na nedostatek K^+ včetně genů metabolismu ROS (reaktivní formy kyslíku). Expresi tohoto faktoru spouští ROS i etylén a bylo prokázáno, že se váže na GCC box v promotoru *AtHAK5* (Kim et al., 2012). Další transkripční faktory spouštějící expresi *AtHAK5* byly recentně objeveny, avšak jejich kontext v regulačních drahách nebyl doposud zkoumán (Hong et al., 2013).

Obrázek 4: Signální dráhy v odpovědi na nedostatek K^+ (Chérel et al., 2014).



AtHAK5 podléhá i post-transkripční regulaci, transportér byl detekován na plazmatické membráně stejně jako na ER a tonoplastu (Qi et al., 2008). Recentně bylo zjištěno, že *AtHAK5* je exprimován i při nedostatku dusíku či fosforu, avšak vysokoafinitní příjem K^+ zprostředkovává jen v jeho nedostatku (Rubio et al., 2014).

Při deficienci K^+ byla rovněž zaznamenána zvýšená exprese genů syntézy kyseliny jasmonové (Armengaud et al., 2004), ta je ovšem asociována spíše s růstovou odpovědí na tento stres než s expresí přenašečů (Cao et al., 2006, Armengaud et al., 2010)

Pro *AtKUP1* byla v heterologní expresi v kvasinkách zjištěna aktivita ve vysokoafinitním i nízkoafinitním transportu K^+ (Fu a Luan, 1998). To ovšem nebylo potvrzeno při expresi v *E. coli*, kde byl zjištěn pouze nízkoafinitní transport (Kim et al., 1998) navíc není známa žádná funkce *AtKUP1 in planta*.

Role KT/HAK/KUP transportérů ve vývoji kořenových vlásků.

Pro inzerční mutanty v přenašeči AtKUP4 bylo zavedeno označení *trh1* (tiny root hair 1). U rostlin *trh1* nedochází k vrcholovému růstu kořenových vlásků i přesto, že v rhizodermis jsou diferencované trichoblasty. Kořenové vlásky u *trh1* tvoří pouze krátké výčnělky na povrchu kořenů (Rigas et al., 2001). *trh1* není alelická mutace k žádnému známému defektu kořenových vlásků ani jeho transkripce není narušena u jiných defektů (Daras et al., 2015).

Překvapivě tento fenotyp není zvrácen ani nadbytkem K⁺ (Rigas et al., 2001, Desbrosses et al., 2003). Rovněž bylo zjištěno, že kořeny *trh1* rostou agravitropicky. Oba fenotypy *trh1* se podařilo zvrátit exogenní aplikací auxinu a heterologní expresí *AtTRH1* v kvasinkách bylo potvrzeno, že transportuje auxin ven z buněk (Vicente-Agullo et al., 2004). Bylo zjištěno, že zatímco auxinové maximum je ve špičce kořene rostlin divokého genotypu lokalizováno především v iniciálách kolumely, kolumele a v klidovém centru, *trh1* rostliny akumulují auxin také ve středním válci, což koresponduje s tím, že TRH1 je v elongační zóně kořene lokalizován na bazálních membránách buněk středního válce kde kolokalizuje s PIN1. TRH1 je navíc přítomen také v pokožce (protodermu) a primární kůře meristematické zóny kořene, kde je lokalizován na membránových kompartmentech. Pravděpodobně tedy přispívá k bazipetálnímu i akropetálnímu transportu auxinu v kořeni. Knock-out *AtTRH1* způsobuje špatnou lokalizaci PIN1 na bazálních membránách ve středním válci, což ještě více narušuje transport auxinu (Rigas et al., 2013).

Prostřednictvím kvasinkového dihybridního systému a bimolekulární fluorescenční komplementace bylo ukázáno, že AtTRH1 formuje dimer za interakce svých C-terminálních domén, což pravděpodobně vede k formaci struktury schopné transportovat auxin (Daras et al., 2015).

Role KT/HAK/KUP transportérů při zavírání průduchů a buněčné expanzi

Gen kódující transportér AtKUP6 má zvýšenou expresi při osmotickém stresu a suchu. Jeho exprese je lokalizována do kořenové špičky, pericyklu a svěřacích buněk průduchů, kde operuje na plazmatické membráně. Detekovatelný fenotyp měly až vícenásobné mutanty *kup6xkup8*, *kup2xkup6xkup8* a *kup6xkup8xgork*. Tyto rostliny měly vyšší čerstvou hmotnost a větší buňky oproti Col-0. Mimo to měly kořeny těchto mutantů větší senzitivitu k exogennímu auxinu a sníženou senzitivitu k ABA a osmotickému stresu, při všech těchto podmínkách zakládaly více postranních kořenů než Col-0. Navíc tyto rostliny postrádají odpověď průduchů na ABA nebo suchu a tedy výrazně ztrácejí vodu a hůře přežívají suchu. Bylo prokázáno, že AtKUP6 je fosforylován SRK2E kinázou účastnící se odpovědi na ABA (Osakabe et al., 2013).

Mutace G419R v přenašeči AtKUP2 způsobovala kratší hypokotyl semenáčků a menší buňky listů. Pro tuto mutaci se vžilo označení *shy3* (short hypokotyl 3). Expresce AtSHY3 byla lokalizována do rostoucích částí rostlin avšak akumulace K⁺ nebyla narušena. Expresce 35S::SHY3 v Col-0 způsobovala *shy3* fenotyp, takže se jedná o dominantní alelu a pravděpodobně o mutaci se ziskem funkce (Elumalai et al., 2002).

Expresce vybraných KT/HAK/KUP transportérů v *A. thaliana*

Pro všechny KT/HAK/KUP geny kromě AtKUP12 a AtHAK5 byla zaznamenána expresce v kořenech *A. thaliana* za kontrolních podmínek (Ahn et al., 2004), nedostatek K⁺ signifikantně zvyšoval expresi pouze pro AtHAK5 (Ahn et al., 2004, Gierth et al., 2005). Data z genového čipu ukazují nezanedbatelnou expresi AtKUP5, AtKUP7 a AtKUP9 v kořenech *A. thaliana*, která v případě AtKUP5 dosahuje úrovně AtHAK5 po 48 h nedostatku K⁺ (viz tabulku 1, Gierth et al., 2005).

Tabulka 1: Expresce vybraných KT/HAK/KUP genů v kořenech *A. thaliana*, upraveno podle Gierth et al. (2005)

Transportér	Kód genu	48		96	
		+ K ⁺	- K ⁺	+ K ⁺	- K ⁺
KUP5	At4g33530	905,0	890,7	730,3	708,0
KUP7	At5g09400	491,8	315,3	481,5	423,3
KUP9	At4g19960	336,4	450,9	339,5	588,9
KUP10	At1g31120	291,9	285,2	275,9	220,8
HAK5	At4g13420	129,4	750,1	85,0	1164,1

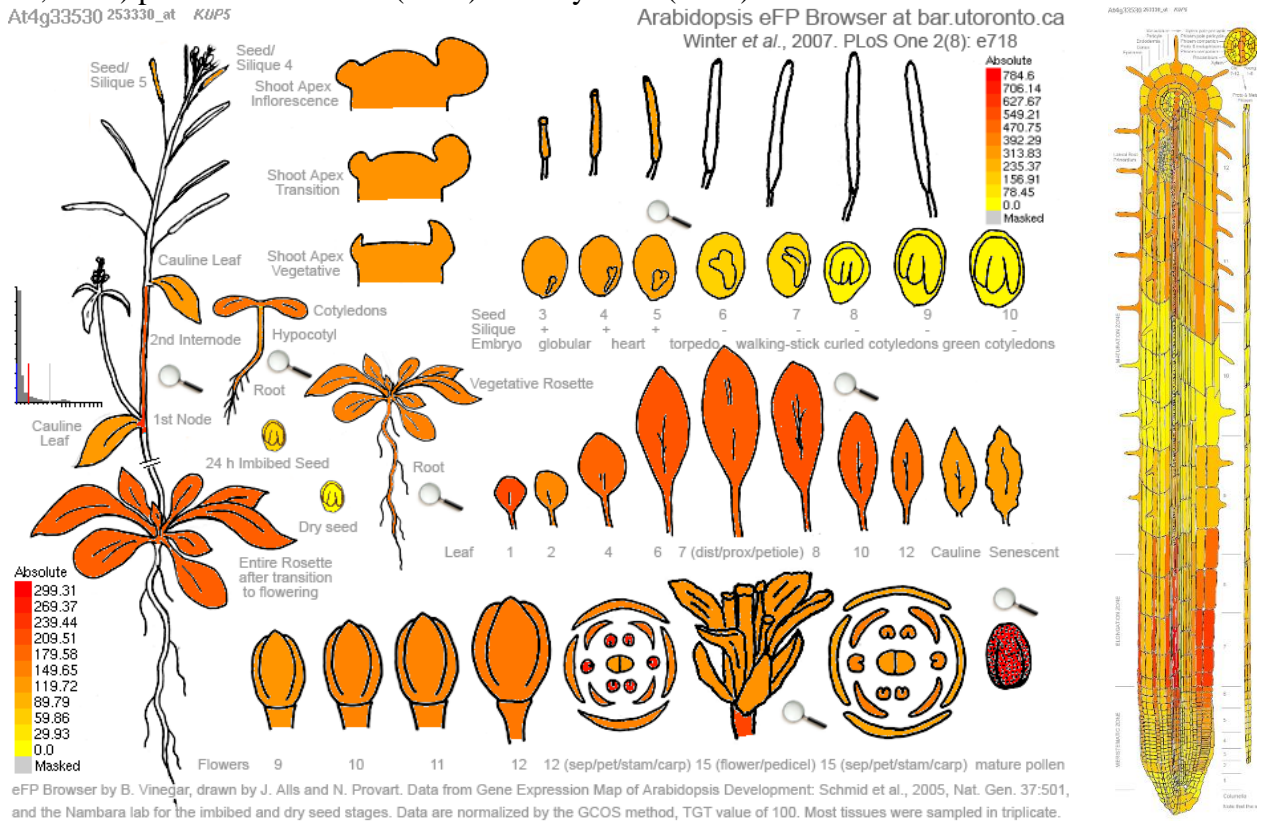
Experimenty sledující expresní vzorce mnoha genů pomocí genových čipů odhalily rovnoměrnou expresi KUP5 v prýtu, především ve vyvinutých listech. V kořenech je jeho expresce silná a je lokalizována do primární kůry a xylému elongační zóny i diferencovaných částí kořene (viz obrázek 5, Schmid et al., 2005, Brady et al., 2007).

Expresce KUP7 je v prýtu velmi nízká s výjimkou semen. V kořeni je KUP7 exprimován zhruba dvakrát více, především v prokambiu a endodermis, menší měrou potom v rhizodermis (viz obrázek 6, Schmid et al., 2005, Brady et al., 2007).

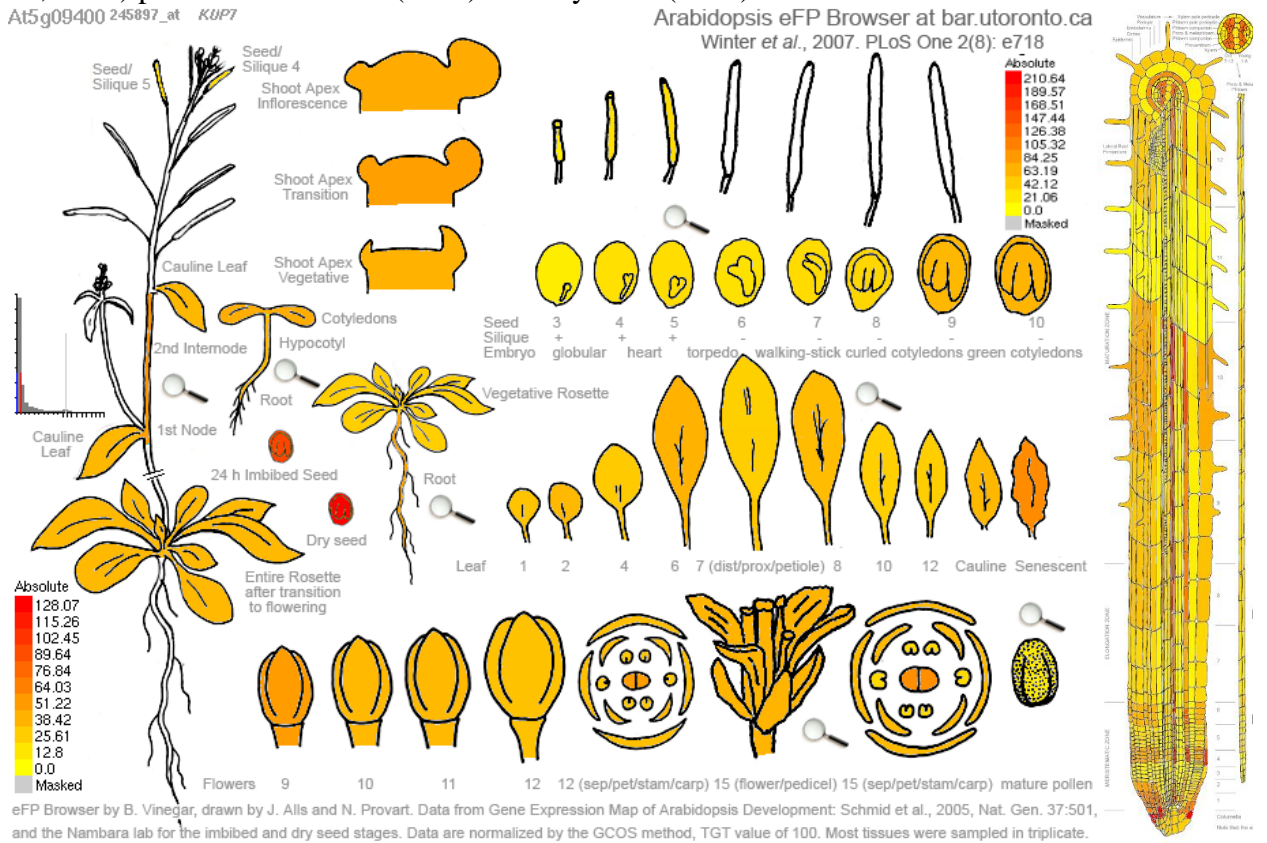
Expresce KUP9 je v prýtu silná pouze ve vyvíjejících se prašnicích, jinak je zanedbatelná. V kořenech byla expresce KUP9 zaznamenána v rhizodermis, primární kůře a cévních svazcích elongační a maturační zóny. Mimo to je KUP9 exprimován v kolumele, avšak expresce není příliš silná (viz obrázek 7, Schmid et al., 2005, Brady et al., 2007).

KUP10 je v prýtu exprimován minimálně. Vyšší expresce byla zaznamenána v elongační zóně kořene a v jeho diferencované části, ve všech buněčných typech s výjimkou endodermis (viz obrázek 8, Schmid et al., 2005, Brady et al., 2007).

Obrázek 5: Expres KUP5 převzato z (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Winter et al., 2007) podle Schmid et al. (2005) a Brady et al. (2007)



Obrázek 6: Expres KUP7 převzato z (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Winter et al., 2007) podle Schmid et al. (2005) a Brady et al. (2007)

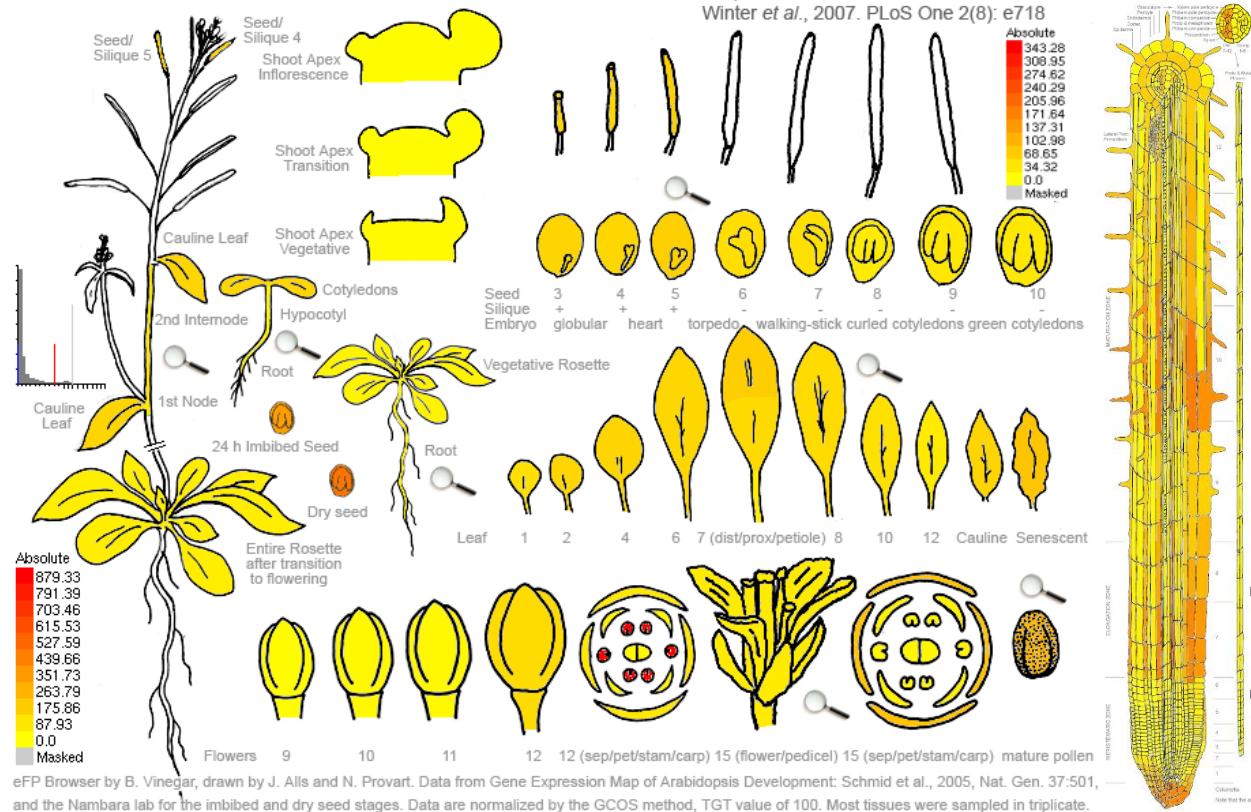


Obrázek 7: Expres KUP9 převzato z (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Winter et al., 2007) podle Schmid et al. (2005) a Brady et al. (2007)

At4g19960 254520_at *AtKUP9*

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca

Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

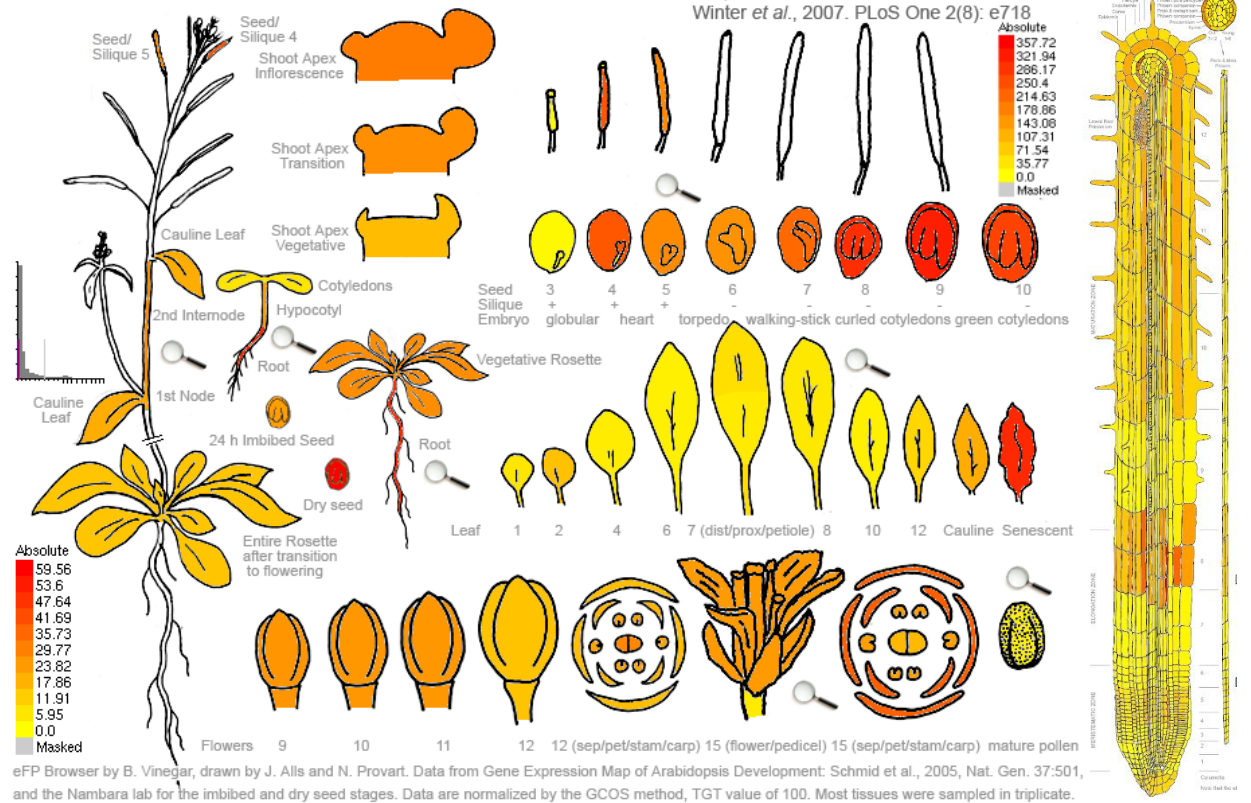


Obrázek 8: Expres KUP10 převzato z (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Winter et al., 2007) podle Schmid et al. (2005) a Brady et al. (2007)

At1g31120 263699_at *KUP10*

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca

Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



2.1.2 KEA transportéry

Šest KEA (K^+ eflux antiporters) transportérů bylo objeveno v genomu *A. thaliana* na základě příbuznosti s bakteriálními K^+/H^+ antiportéry (Mäser et al., 2001). Bylo zjištěno zvýšení exprese KEA5 při nedostatku K^+ , avšak tento transportér nebyl blíže zkoumán (Shin a Schachtman, 2004)

2.1.3 CHX transportéry

Na základě homologie se savčími a kvasinkovými Na^+/H^+ antiportéry bylo v genomu *A. thaliana* objeveno 28 CHX (cation/ H^+ exchanger) transportérů (Mäser et al., 2001). Pro AtCHX17 bylo zjištěno, že transportuje K^+ a jeho gen je exprimován v rhizodermis a kůře kořene. Vzhledem k tomu, že *atchx17* mutantní rostliny akumulovaly méně K^+ při jeho nedostatku, je AtCHX17 zřejmě zapojen do příjmu a homeostáze K^+ (Cellier et al., 2004)

2.1.4 Shaker-like kanály

Shaker-like kanály jsou tvořeny tetramery α podjednotek. Bylo prokázáno, že různé rostlinné α podjednotky mohou tvořit heterotetramery, včetně tranzientně exprimovaných podjednotek z různých druhů (Dreyer et al., 1997). V interakci α podjednotek je zapojena C-terminální cytoplazmatická doména (Daram et al., 1997).

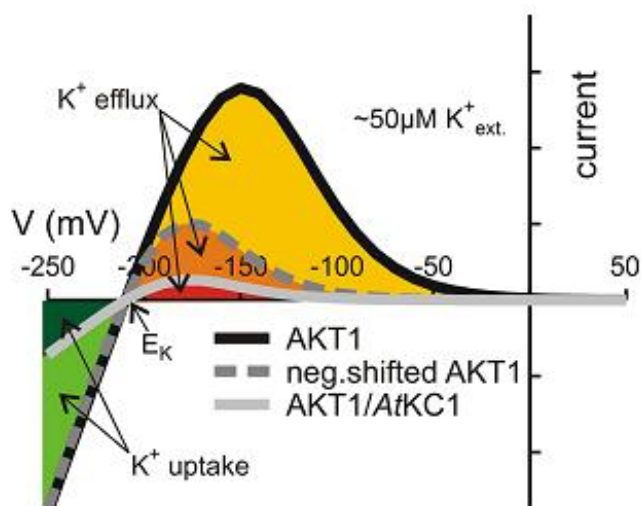
První naklonovanou α podjednotkou z rostlin byla AtAKT1 (Sentenac a Bonneaud, 1992). Následně se podařilo najít její homology v dalších modelových druzích, například: bramboru (*Solanum tuberosum*, Zimmermann et al., 1998), pšenici (*Triticum aestivum*, Buschmann et al., 2000) a rýži (*Oryza sativa*, Gollack et al., 2003). AKT1 je zapojen do příjmu K^+ již v tak nízkých koncentracích externího K^+ jako je 10 μ M (Hirsch et al., 1998). Jeho podíl na příjmu K^+ při koncentracích nad 0,1 mM byl vypočítán na přibližně 60 % (Spalding et al., 1999, Gierth a Mäser, 2007), pro koncentrace nižší se výpočty liší. Mutantní rostliny *akt1* vykazovaly snížený růst při 0,1 mM K^+ za přítomnosti NH_4^+ v médiu, který blokuje vysokoafinitní příjem K^+ (Hirsch et al., 1998, Spalding et al., 1999).

Jiná α podjednotka KC1 měla stejný expresní vzorec jako AKT1 (kořenové vlásky a primární kůra kořenů s lokalizací proteinu na plazmatické membráně). Tato podjednotka netvoří homomerní kanály, ale pouze heteromery s AKT1, které mají odlišné vlastnosti (Reintanz et al., 2002). Má tedy především regulační funkci. Bylo zjištěno, že KC1 má větší afinitu k AKT1 než AKT1 podjednotky mezi sebou (Dubey et al., 2008). Heteromery AKT1 a KC1 se otevírají při nižším

membránovém napětí (-100 – -160 mV) tedy při vyšší koncentraci externího K^+ , navíc je jejich konduktivita nižší. Tento mechanismus zabraňuje značným výtokům K^+ při jeho nízké externí koncentraci, avšak rovněž snižuje kapacitu příjmu tohoto kanálu (viz obrázek 9, Geiger et al., 2009, Wang et al., 2010). Není zatím jasné, jak ovlivňuje KC1 růst na nižších koncentracích K^+ neboť inzerční mutanty *kc1* vykazovaly ve dvou pracích opačné růstové fenotypy při 0,1 mM K^+ (Geiger et al., 2009, Wang et al., 2010). Zatímco Geiger et al. (2009) popisuje zhoršený růst semenáčků *kc1* v důsledku ztráty K^+ , Wang et al. (2010) zjistil vyšší akumulaci K^+ u *kc1* mutantů. Je otázkou jakou evolučně selektovanou funkci má KC1, pokud by bylo pravdou, že omezuje růst při 0,1 mM K^+ , rovněž n = 3 v práci Wang et al. (2010) nebudí velkou důvěru.

Podjednotka AKT1 je aktivována fosforylací CIPK23 (CBL interacting protein kinase), tato

Obrázek 9: Závislost toku K^+ na membránovém potenciálu (Geiger et al., 2009)



kináza je aktivní pouze po navázání kalmodulinu podobných proteinů CBL1 a CBL9 (Calcinuerin B-like), jejichž funkce je redundantní (Xu et al., 2006). Tato interakce je velmi specifická, CIPK23 neinteraguje s KC1 a AKT1 není aktivován žádnou další CIPK kinázou (Geiger et al., 2009).

Dalšími důležitými shaker-like kanály jsou například KAT1 a GORK, jenž participují na pohybech průduchů (Szyroki et al., 2001, Hosy et al., 2003). GORK je rovněž exprimován v kořeno-

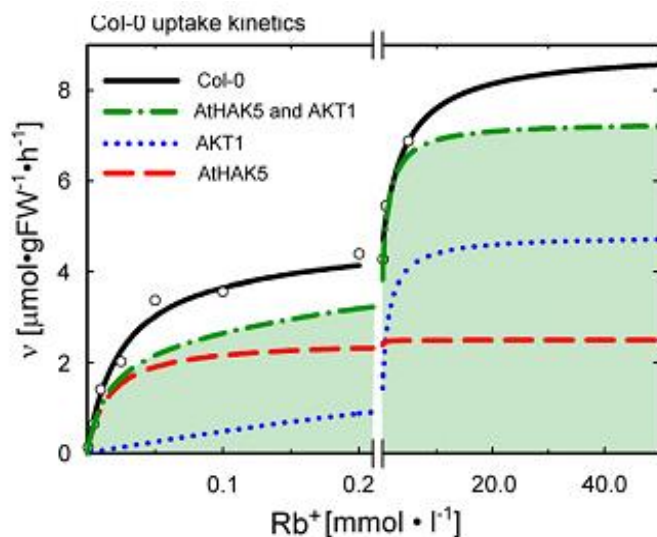
vých vláscích, kde při depolarizaci membrány zprostředkovává výtok K^+ (Ivashikina et al., 2001).

SKOR se podílí na nakládání K^+ do xylému (Gaymard et al., 1998) a AKT2/3 kanály vznikající z dvou počátků transkripce jednoho lokusu regulují sacharózové přenašeče při nakládání floému cukry (Deeken et al., 2002).

2.1.5 Souhra transportních systémů

Pro *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že na příjmu K^+ se téměř výhradně podílí přenašeč HAK5 a kanál AKT1 (viz obrázek 10). Zkratka AKT1 v této kapitole odkazuje na kanály složené

Obrázek 10: Podíl aktivity AKT1 a HAK5 na příjmu K^+ za jeho různých koncentrací (Gierth a Mäser, 2007)



z AKT1 a KC1 podjednotek, v citovných studiích byly použity *akt1* mutanty, které téměř postrádají nízkoafinitní příjem K^+ (Reintanz et al., 2002). Pro dvojnásobné mutanty *hak5xakt1* nebyl naměřen téměř žádný příjem K^+ (Rubio et al., 2010, Coskun et al., 2013). U jednoduchých mutantů je situace poněkud složitější, protože *akt1* exprimuje *HAK5* nezávisle na dostupnosti K^+ a to i za přítomnosti NH_4^+ . Exprese *AKT1* se nemění v závislosti na dostupnosti K^+ a je pravděpodobně dostačující k přežití

rostliny na vyšších koncentracích K^+ , neboť jeho exprese je v *hak5* nezměněná (Rubio et al., 2008).

Vysokoafinitní příjem u *Arabidopsis thaliana* je zprostředkováván HAK5 i AKT1 a je tedy částečně blokovatelný TEA, inhibitorem K^+ kanálů (Coskun et al., 2013). Aplikací NH_4^+ a Ba^{2+} se podařilo zablokovat příjem úplně (Rubio et al., 2008). Krátkodobý příjem K^+ vyjádřený jako tok v $mol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ byl naměřen nižší pro *hak5* (Rubio et al., 2008, Rubio et al., 2010), ovšem obsah K^+ v sušině se při dlouhodobé kultivaci nelišil od Col-0. Oproti tomu *akt1* má relativní příjem i růstové parametry při $40 \mu M K^+$ vyšší než kontrola, díky vyšší expresi HAK5 (Rubio et al., 2010). Dvojnásobně mutantní rostliny *hak5xakt1* jsou při klíčení velmi náchylné k NH_4^+ (Pyo et al., 2010), důvod tohoto není zcela zřejmý, protože ačkoli nedostatek K^+ prohlubuje toxicitu NH_4^+ , tak například u ječmene (*Hordeum vulgare*) je vysokoafinitní příjem zcela blokován NH_4^+ , ale k toxicitě dochází až při mnohem vyšších koncentracích NH_4^+ (Coskun et al., 2013).

Při koncentracích nad $0,1 \text{ mM } K^+$ je hlavním přenašečem AKT1. V těchto koncentracích nemá *hak5* žádný fenotyp, oproti tomu *akt1* jeví sníženou kinetiku příjmu i nižší obsah K^+ v pletivech, u dvojnásobných mutantů fenotyp kopíruje *akt1* (Rubio et al., 2008, Rubio et al., 2010). Při dlouhodobých kultivacích bylo zjištěno, že dvojnásobně mutantní rostliny jsou schopny příjmu K^+ (Rb^+) při externí koncentraci $0,5 \text{ mM}$, při koncentraci 10 mM jsou už i tyto rostliny nerozeznatelné od

kontroly (Rubio et al., 2010). Příjem K^+ u dvojitých mutantů byl inhibován Ca^{2+} a chemickým homologem cyklických nukleotidů, takže příjem zprostředkovávají pravděpodobně CNGC (cyclic nucleotide gated channels), ovšem vyřazení CNG3, CNG10 ani CNG13 v dvojitých mutantech *hak5xakt1* nevedlo ke zhoršení příjmu K^+ (Caballero et al., 2012).

U *A. thaliana* je tedy možné tvrdit, že se na velké části příjmu podílí dva přenašeče a zbývající část je pravděpodobně zprostředkována neselektivními kanály jako jsou CNGC. Tento model ovšem jistě není všeobjímající a v budoucnu mohou být nalezeny rostliny, které zabezpečují příjem K^+ větším počtem přenašečů.

Další z mnoha K^+ přenašečů se podílí na udržování K^+ homeostáze, jeho redistribuci či osmoregulaci, jak bylo popsáno v předchozích kapitolách.

2.2 Příjem Cs^+ rostlinami

Už od počátků studia kinetiky příjmu K^+ bylo pozorováno podobné chování příjmu chemických analogů K^+ : Rb^+ a Cs^+ (Epstein a Hagen, 1952). Zvýšený zájem o příjem Cs^+ rostlinami nastal v 60. letech, kdy se kvůli testům jaderných zbraní stalo Cs^+ globálním polutantem. Mnohem více Cs^+ se do ekosystémů dostalo v roce 1986 při výbuchu jaderné elektrárny Černobyl a v roce 2011 při havárii jaderné elektrárny ve Fukušimě.

Radioizotopy ^{134}Cs a ^{137}Cs jsou produkty rozpadové řady obohaceného uranu a mají jako první produkty dlouhý poločas rozpadu (2 roky respektive 30 let). Tyto izotopy jsou antropogenní a v ekosystémech se objevily až po výše zmíněných událostech. Od té doby se vyskytují v půdách a rostliny jsou jejich vstupní branou do dalších organismů.

Příjem Cs^+ rostlinami je výrazně ovlivněn půdními podmínkami stejně jako genotypem. Chování Cs^+ v půdách určují tak jako u jiných kationtů především jílové částice. Půdy s vysokým obsahem jílových částic lépe sorbují Cs^+ , které je tak méně dostupné rostlinám (Giannakopoulou et al., 2007). Oproti tomu půdy s obsahem organického materiálu vyšším než 90 % sorbují Cs^+ jen nespecificky a to je velmi dostupné rostlinám (Rigol et al., 2002). U 40 druhů rostlin, především zemědělských plodin a travin, byly zjištěny výrazné rozdíly v příjmu Cs^+ , které ovšem byly vysvětleny odlišností půd (Andersen, 1967).

Pro čtyři významné plodiny byly zjištěny signifikantní rozdíly v příjmu Cs^+ ve všech nutričních scénářích (Buysse et al., 1996). Nízká akumulace Cs^+ byla zjištěna pro bobovité rostliny (*Fabaceae*, Fuhrmann et al., 2002), oproti tomu nejvyšších akumulací Cs^+ dosahují halofytní rostliny například z čeledí *Amaranthaceae* a *Chenopodiaceae* (Broadley a Willey, 1997, Fuhrmann et al.,

2002). Signifikantní rozdíly byly zjištěny i pro různé ekotypy *Arabidopsis thaliana* a odrůdy pšenice (Payne et al., 2004, Putyatin et al., 2006).

2.2.1 Mechanismus příjmu Cs⁺

Kinetika příjmu Cs⁺ je závislá na externí koncentraci K⁺. V rozmezí 50 μM až 250 μM externího K⁺ došlo k třicetinasobnému snížení příjmu Cs⁺. Při vyšších koncentracích je vliv výrazně menší, ale znatelný (Smolders et al., 1996). Vliv má rovněž stav rostliny: rostliny deficientní pro draslík přijímaly Cs⁺ v krátkodobé kultivaci efektivněji než rostliny nestresované bez ohledu na dostupnost K⁺ (Zhu et al., 2000). Tento efekt byl vysvětlován zapojením dvou systémů příjmu K⁺ s rozdílnou selektivitou pro K⁺, což se v nedávné době podařilo potvrdit (White a Broadley, 2000, Rubio et al., 2008)

Přítomnost NH₄⁺ v některých studiích snižovala příjem Cs⁺ (Handley a Overstreet, 1961, Shaw et al., 1992), při použití kompletního média však neměla vliv (Smolders et al., 1997)

Kandidátní přenašeče pro transport Cs⁺ můžeme hledat v rodině KT/HAK/KUP. Pro transportér zajišťující vysokoafinitní K⁺ výživu AtHAK5 byl prokázán transport Cs⁺ při heterologní expresi v kvasinkách, stejně tak tomu bylo u jeho homologů z jiných modelových druhů HvHAK1, OsHAK5, CaHAK5 (Rubio et al., 2000, Bañuelos et al., 2002, Martínez-Cordero et al., 2004). Mutant *athak5* ovšem vykazoval signifikantně snížený příjem Cs⁺ jen u semenáčků (Qi et al., 2008). Transport Cs⁺ při heterologní expresi byl rovněž prokázán pro KUP9 (Kobayashi et al., 2010)

Dominantní systém příjmu K⁺ kanál AtAKT1 téměř nepřispívá k příjmu Cs⁺, neboť *atakt1* rostliny nevykazují žádné rozdíly proti kontrolním (Broadley et al., 2001).

Velká část příjmu tedy pravděpodobně závisí na nespecifických kanálech. Exprese AtCNGC10 v *E. coli* vedla k akumulaci toxických koncentrací Cs⁺ v buňkách, navíc u kořenových protoplastů *Arabidopsis thaliana* byl zjištěn příjem Cs⁺ blokovatelný chinonem, La⁺³ a Gd⁺³, což odpovídá senzitivě CNGC (Demidchik et al., 2004).

3 Metodika

3.1 Biologický materiál a kultivační podmínky

3.1.1 Rostlinný materiál

Byly používány linie modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Za účelem propagace linií nebo jejich křížení byly rostliny pěstovány na rašelinových tabletách (Jiffy) při teplotě 23°C, relativní vlhkosti 45 %, fotoperiodě 16 h světlo a 8 hodin tma a ozáření v úrovni rostlin 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Před vysetím byla semena povrchově sterilizována chlornanem sodným (20% SAVO) s 1% tri-tonem po dobu 15 min. Poté byla třikrát oplachována destilovanou vodou 1 min.

3.1.2 Bakteriální kmeny

Pro elektroporaci a množení plazmidů s klonovaným fragmentem byly použity bakterie *Escherichia coli* kmene DH5 α . Bakterie byly kultivovány aerobně při 37 °C na pevném LB médiu (viz tab. 2) s přidavkem 1,5% agaru, nebo ve 3 ml tekutého LB média ve třepačce při 180 kmitoch/min. Kultivace probíhaly přes noc tedy 17 – 20 h.

Transformace rostlin byla provedena bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* kmen: C58C1 (Deblaere et al., 1985). Bakterie byly kultivovány 48 h aerobně při 28 °C na pevném LB médiu s přidavkem 1,5% agaru (viz tabulku 2), nebo 72 h v tekutém LB médiu ve třepačce při 180 kmitoch/min.

Veškerá práce s bakteriemi byla prováděna sterilně ve flowboxu (LaminAir Flow Box HP 72, Heraeus Instruments).

Tabulka 2: Složení LB média

Komponenta	Koncentrace (g/l)
Pepton	10
Kvasničný extrakt	10
NaCl	10
Agar	15
Destilovaná voda	Do požadovaného objemu

3.2 Práce s DNA

3.2.1 Izolace DNA pro genotypování

Genomická DNA byla izolována podle upraveného protokolu z (Edwards et al., 1991). Pro každou rostlinu byl jeden středně velký mladší list s trichomy, který má nejvýhodnější poměr obsahu DNA k objemu pletiva, vložen do 2 ml zkumavky a byla k němu přidána jedna mlecí kulička z nerezové oceli. Zkumavka byla poté na několik minut ponořena do tekutého dusíku. Zkumavky byly vloženy do vychlazené kazety vibračního mlýnu (Retsch MM301), který listy 30 s homogemizoval při 30 kmitech za sekundu. K homogenátu bylo přidáno 200 µl extrakčního pufru (viz tabulku 3). Vzorky byly řádně zamíchány a byly odstraněny kuličky. Vzorky byly odstředěny 2 min při 14000 ot/min. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a bylo k němu přidáno 200 µl izopropanolu p.a.. Směs byla promíchána a ponechána 2 min v klidu a poté odstředěna 4 min při 14000 ot/min. Supernatant byl odsát a nahrazen 1 ml 70% etanolu. Vzorky byly odstředovány 5 min při 14000 ot/min a poté byl supernatant odsát a pelety byly 5 min vysušeny při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno 45 µl destilované vody a 5 µl 10x koncentrovaného TE pufru (viz tabulku 4).

Z důvodu postupného rozpouštění DNA z pelety do TE pufru byly vzorky použity pro PCR nejdříve další den. Vzorky byly skladovány při 4 °C maximálně 1 měsíc.

Tabulka 3: Složení extrakčního pufru

Komponenta	Koncentrace
Tris HCl, pH = 7,5	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 %
Destilovaná voda	Do požadovaného objemu.

Tabulka 4: Složení TE pufru

Komponenta	Koncentrace
Tris HCl, pH = 8	10 mM
EDTA	1 mM
Destilovaná voda	Do požadovaného objemu.

3.2.2 Izolace DNA pro klonování

DNA byla izolována podle modifikovaného protokolu z (Murray a Thompson, 1980). Rostlinný materiál byl odebrán a homogenizován, jak je popsáno v kapitole 3.1.1. K doposud zmraženému homogenátu byl přidán 0,5 ml 2x CTAB (viz tabulku 5) a byly odstraněny kuličky. Vzorky poté byly inkubovány 15 min při 65 °C a 300 kmitech za minutu. K vychladlým vzorkům byl přidán 1 ml směsi chloroform:izoamylalkohol (24:1) a vzorky byly promíchány převrácením zkumavky. Vzorky byly odstředovány 5 min při 14 000 ot/min. Zhruba 0,5 ml vrchní vodní fáze bylo přeneseno do čisté zkumavky. Byl přidán 1 ml 100% etanolu a vzorky byly 2 min překlápením

promíchávány. Poté byly vzorky na 15 min inkubovány při 4 °C a následně odstředovány 5 min při 14000 ot/min. Supernatant byl odsán a peleta byla promyta 70% etanolem. Následně byly vzorky odstředovány 10 min při 14000 ot/min. Poté byl etanol odsán a vzorky byly 2 min vysušovány při 37 °C. Bylo přidáno 36 µl sterilní destilované vody a 4 µl 10x koncentrovaného TE pufru. Peleta byla rozpouštěna při 37 °C a 300 kmitech za minutu po dobu 30 min.

Tabulka 5: Složení 2x CTAB

Komponenta	Koncentrace
Tris HCl pH = 8,0	100 mM
CTAB	2 %
EDTA	20 mM
NaCl	1,4 M
PVP	2 %
β merkaptoetanol (těsně před použitím)	0,2 %
Destilovaná voda	do požadovaného objemu

3.2.3 Polymerázová řetězcová reakce pro genotypování

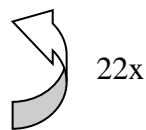
Polymerázová řetězcová reakce (PCR) byla použita pro ověření přítomnosti inzerční T-DNA. Složení 20 µl reakční směsi ukazuje tabulka 6. Nastavení termocyklieru shrnuje tabulka 7.

Tabulka 6: Složení reakční směsi PCR pro genotypování

Komponenta	Koncentrace zásobního roztoku	Použitý objem (µl)
Vyizolovaná DNA	-	2
Taq DNA polymeráza (Thermo Scientific)	5 U/µl	0,25
dNTP	10 mM	0,4
Primer RP	20 µM	2
Primer LP/LB	20 µM	2
MgCl ₂	25 mM	1,2
Taq reakční pufr	10x koncentrovaný	2
Destilovaná voda	-	10,15

Tabulka 7: Nastavení termocyklieru pro genotypování

Fáze cyklu	Teplota	Čas (min)
Iniciální denaturace	94 °C	2:00
Denaturace	94 °C	0:30
Nasedání primerů	55 °C	1:00
Syntetická fáze	72 °C	1:00
Terminální syntetická fáze	72 °C	10:00
Zchlazení	4 °C	∞



22x

3.2.4 Polymerázová řetězcová reakce z bakteriálních kolonií


Pro ověření úspěšné transformace bakterií byla použita PCR. Do zkumavek byla ve flowboxu (LaminAir Flow Box HP 72, Heraeus Instruments) sterilním párátkem převedena malá část bakteriální kolonie, poté bylo přidáno 20 μl reakční směsi (viz tabulka 8). Nastavení termocyklu je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro PCR z bakteriálních kolonií

Komponenta	Koncentrace zásobního roztoku	Přidaný objem (μl)
Taq DNA polymeráza (Thermo Scientific)	5 U/ μl	0,25
dNTP	10 mM	0,4
Taq reakční pufr	10x koncentrovaný	2
MgCl ₂	25 mM	1,2
KpnIpKUP9 - přímý	20 μM	0,5
NotIpKUP9 - převrácený	20 μM	0,5
Destilovaná voda	-	15,15

Tabulka 9: Nastavení termocyklu pro PCR z bakteriálních kolonií

Fáze cyklu	Teplota	Čas (min)
Iniciální denaturace	94 °C	2:00
Denaturace	94 °C	0:30
Nasedání primerů	60 °C	1:00
Syntetická fáze	72 °C	1:10
Terminální syntetická fáze	72 °C	10:00
Zchlazení	4 °C	∞



22x

3.2.5 Amplifikace promotorové sekvence


Pro amplifikaci promotorové sekvence bylo použito proofreading polymerázy Phusion (NEB). Pro složení 50 μ l reakce a nastavení termocyklu viz tabulky 10 a 11.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro amplifikaci promotorové sekvence

Komponenta	Koncentrace zásobního roztoku	Přidaný objem (μ l)
Genomová DNA	-	2
Phusion DNA polymeráza (NEB)	2 U/ μ l	0,25
dNTP	10 mM	1
KpnI _p KUP9 - přímý	20 μ M	1,25
NotI _p KUP9 - převrácený	20 μ M	1,25
Phusion reakční pufr	5x koncentrovaný	10
Destilovaná voda	-	34,25

Tabulka 11: Nastavení termocyklu při amplifikaci promotorové sekvence

Fáze cyklu	Teplota	Čas (min)
Iniciální denaturace	98 °C	2:00
Denaturace	98 °C	0:30
Nasedání primerů	60 °C	0:30
Syntetická fáze	72 °C	1:20
Terminální syntetická fáze	72 °C	10:00
Zchlazení	4 °C	∞

 33x

3.2.6 Agarózová gelová elektroforéza

Elektroforéza byla prováděna v gelu připraveném rozvařením 1,2% agarózy v 0,5x TAE pufru (viz tabulku 12). Do gelu byla přidána GelRed (Biotium) v poměru 10 μ l/100 ml. Gel byl ponořen v 0,5x TAE pufru a pro snadné dávkování byl do vzorku přidán barvicí roztok v poměru 1:5. Složení barvicího roztoku ukazuje tabulka 13. Napětí bylo nastaveno na 50 V.

Tabulka 12: Složení 0,5x TAE

Komponenta	Koncentrace
Tris base	20 mM
kyselina octová	10 mM
EDTA	0,5 mM
Destilovaná voda	Do požadovaného objemu

Tabulka 13: Složení barvicího roztoku

Komponenta	Koncentrace
Tris-HCl (pH = 7,6)	10 mM
Bromfenolová modř	0,03 %
Glycerol	60 %
EDTA	60 mM
Destilovaná voda	Do požadovaného objemu

3.2.7 Měření koncentrace DNA

Koncentrace byla stanovována spektrofotometricky na přístroji NanoDrop (Thermo Scientific). Na podstavec měřicího zařízení bylo nanášeno 1,5 μl roztoku. Před každým měřením bylo proměřeno pozadí roztoku bez DNA.

3.2.8 Restrikční reakce

Restrikční reakce byly využívány pro dva účely. Zaprvé pro vytvoření kohezivních konců na řetězci DNA, které umožňují specificky k sobě ligovat molekuly DNA, a zadruhé jako kontrola čistoty purifikovaných plazmidů.

Reakce pro vytvoření kohezivních konců byly připravovány, jak shrnuje tabulka 14. Reakce byly inkubovány ve 37 °C přes noc, tedy 17 – 20 h.

Reakce pro kontrolu čistoty plazmidů byly inkubovány ve 37 °C 2 h. Pro složení reakční směsi viz tabulku 14.

Tabulka 14: Složení restrikčních reakcí

Komponenta	Množství pro tvoření kohezivních konců	Množství pro kontrolu čistoty
DNA	1 mg	2 μl
Restrikční enzymy (NEB)	po 0,5 μl	po 0,5 μl
10x reakční pufr	4 μl	2 μl
Destilovaná voda	Doplnit do 40 μl	Doplnit do 20 μl

3.2.9 Elektroporace

Elektroporační kyvety a roztok DNA byly ponechány vychladnout na ledu. Elektrokompetentní bakterie mezitím na ledu rozmrzly. Použité elektrokompetentní bakterie byly připraveny Bc. Terezou Šnajdrovou dle běžného protokolu (Miller a Nickoloff, 1995). Ke kompetentním bakteriím byl přidán 1 μl DNA a po jedné minutě byly bakterie přeneseny do elektroporační kyvety. Kyveta byla osušena a vložena do elektroporátoru (Eporator, Eppendorf), byl aplikován elektrický impuls o napětí 2500 V pro *E. coli* nebo 2000 V pro *A. tumefaciens*. Do kyvety bylo vstříknuto 0,7 ml S.O.C. média (viz tabulku 15). Médium s bakteriemi bylo přelito do skleněné zkumavky a bylo inkubováno v třepačce 1 h při 37 °C u *E. coli* nebo 3 h při 28 °C pro *A. tumefaciens*. Poté byl celý obsah zkumavky sterilně vyset na Petriho misku s pevným LB médiem (viz tabulka 2) a příslušným antibiotikem.

Tabulka 15: Složení S.O.C. média

Komponenta	Koncentrace
Pepton	2,0 %
Kvasničný extrakt	0,5 %
Glukóza	20 mM
NaCl	10 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Destilovaná voda	Do požadovaného objemu

3.3 Linie *Arabidopsis thaliana*

Pro studované transportéry byly ve veřejné databázi (<http://signal.salk.edu/>) nalezeny homozygotní T-DNA inzerční mutantní linie *Arabidopsis thaliana*. Tyto linie nemají transkript schopný produkovat funkční transportér. Vybrané linie shrnuté v tabulce 16 byly objednány z veřejných zdrojů (<http://arabidopsis.info/>).

Tabulka 16: T-DNA inzerční linie použité pro experimenty

Transportér Kód genu	Označení linie v textu diplomové práce	Kód produktu (NASC ID)	Název linie	Místo vložení T-DNA
KUP5 <i>At4g33530</i>	<i>kup5-1</i>	N654380	SALK_120707C	5. exon
KUP7 <i>At5g09400</i>	<i>kup7-1</i>	N695611	SALK_206158S	10. exon
KUP9 <i>At4g19960</i>	<i>kup9-1</i>	N670022	SALK_108080C	9. exon
KUP9 <i>At4g19960</i>	<i>kup9-2</i>	N862313	SAIL_211_E04	2. intron
KUP10 <i>At1g31120</i>	<i>kup10-1</i>	N667307	SALK_129492	Promotor
HAK5 <i>At4g13420</i>	<i>hak5-1</i>	N656123	SALK_005604C	4. exon
HAK5 <i>At4g13420</i>	<i>hak5-2</i>	N672728	SALK_074868C	4. exon

Přítomnost inzerce v obou alelách genů byla ověřována pomocí PCR. Genomová DNA byla izolována, jak je popsáno v kapitole 3.2.1. Byly použity primery navržené pro efektivní ověřování takovýchto inzerčních linií, jejichž sekvenci je pro každou linii možno zjistit ve veřejně dostupném nástroji institutu SALK (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Sekvence primerů použitých pro jednotlivé linie shrnuje tabulka 17. Dvojice primerů LP a RP je specifická pro sekvenci daného

genu a poskytuje produkt za nepřítomnosti inzerční T-DNA. Primer LB je pro všechny linie identický a je specifický pro sekvenci T-DNA, primery LB a RP poskytují produkt v přítomnosti inzerční T-DNA v předpokládaném regionu. PCR byla provedena, jak je popsáno v kapitole 3.2.3. Výsledky reakcí byly ověřeny pomocí elektroforézy (viz kapitolu 3.2.6).

Tabulka 17: Sekvence primerů použitých pro genotypování.

Linie-primer	Sekvence
<i>kup5-1-LP</i>	TCCCAAATCAACTTCCATCAG
<i>kup5-1-RP</i>	CAGCAAGAGGCAAGGTAACAC
<i>kup7-1-LP</i>	CATTCCATGGTCATTTTCGTC
<i>kup7-1-RP</i>	GCGCAAAAACGAGATTCTATG
<i>kup9-1-LP</i>	AATGTCAGTCTGGCATTACGC
<i>kup9-1-RP</i>	ACATGATCGGATTGCTTCTTG
<i>kup9-2-LP</i>	ACCAGAGTTGTTTGTGCTGC
<i>kup9-2-RP</i>	TACTTTGATCCCACCAGTTGC
<i>kup10-1-LP</i>	TGCACCAAAACCGAAAACACTAC
<i>kup10-1-RP</i>	GTCCCCAAAAGACAGAGACAG
<i>hak5-1-LP</i>	TAAACGCAGGAGGAACATTTG
<i>hak5-1-RP</i>	CCTAGATCAGCAAACATTGCC
<i>hak5-2-LP</i>	CATAGCTTTTGTCACTTTGATTC
<i>hak5-2-RP</i>	TTGTTGAGTTTACTTTGGCCG
LB	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

3.3.1 Kontrolní genotyp

Pro transformaci a kultivace byl použit ekotyp Col-0 (NASC ID: N60000) zakoupený z veřejných zdrojů (<http://arabidopsis.info/>). Pro odstranění genetického pozadí byl pro kultivace vyštěpen kontrolní genotyp bez inzerční T-DNA v F2 generaci kříženců *kup5-1* a *kup7-1*. Křížení a ověření přítomnosti inzerční T-DNA bylo provedeno, jak je popsáno v kapitolách 3.9 a 3.3.

3.4 Kultivace rostlin *in vitro*.

Semena byla povrchově sterilována roztokem chlornanu sodného (20% roztok SAVO) s 1% tritonem po dobu 15 min. Semena byla poté ve flowboxu (LaminAir Flow Box HP 72, Heraeus Instruments) třikrát opláchnuta sterilní destilovanou vodou 1 min. Semena byla ve flowboxu asepticky vyseta na pevné živné médium ve čtvercových Petriho miskách o délce strany 10 cm. Do každé Petriho misky bylo vyseto právě pět semen. Petriho misky se semeny byly 3 dny skladovány ve tmě při teplotě 4 °C a poté byly umístěny do kultivační místnosti s teplotou 21 °C, vlhkostí 55 %, fotoperiodou 16 h světlo 8 h tma a ozářeností v úrovni rostlin 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Misky byly umístěny v držácích šikmo, pod úhlem 45°.

3.4.1 Příprava Petriho misek s médii

Kultivační média byla odvozena od 0,2x MS média (Murashige a Skoog, 1962), s přidavkem 1% agaru a 1% sacharózy, v několika variantách. V základu se varianty lišily obsahem NH_4Cl , protože NH_4^+ blokuje expresi klíčového draselného přenašeče HAK5 už v koncentraci 100 μM (Qi et al., 2008). Dále byly rozlišovány varianty kontrolní a varianty indukující stres nedostatku draslíku. Varianta kontrolní obsahovala 4,01 mM koncentraci draslíku, varianta indukující stres nedostatku draslíku obsahovala draslík v koncentraci 1 μM a ostatní draselné soli byly v této variantě nahrazeny soli sodnými. Obsahy jednotlivých solí v médiu přehledně shrnuje tabulka 18. pH médií bylo upraveno NaOH na přibližnou hodnotu 5,6. Média byla poté autoklávována 1 h a dávkována do Petriho misek po přibližně 50 ml.

Tabulka 18: Obsahy solí v médiích

Látka	Koncentrace (μM)			
	Kontrolní médium s NH_4^+	Stresové médium s NH_4^+	Kontrolní médium bez NH_4^+	Stresové médium bez NH_4^+
NH_4Cl	4000,00	4000,00	0,00	0,00
KNO_3	3758,65	0,00	3758,65	0,00
KH_2PO_4	249,83	0,00	249,83	0,00
NaNO_3	0,00	3752,94	0,00	3752,94
NaH_2PO_4	0,00	250,04	0,00	250,04
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300,18	300,18	300,18	300,18
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	598,56	598,56	598,56	598,56
H_3BO_4	20,05	20,05	20,05	20,05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,02	0,02	0,02
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,02	0,02	0,02
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	20,02	20,02	20,02	20,02
$\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20,00	20,00	20,00	20,00
MnSO_4	22,38	22,38	22,38	22,38
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,21	0,21	0,21	0,21
KI	1,00	1,00	1,00	1,00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,98	5,98	5,98	5,98

3.5 Měření růstových parametrů rostlin

Rostliny byly kultivovány *in vitro*, jak je popsáno v kapitole 3.4. Po 10 dnech kultivace, než se hlavní kořeny dotkly dolního okraje misky, byly intaktní rostliny přes dno skenovány za účelem vyhodnocení růstových parametrů kořenů. Snímky v rozlišení 1200 dpi a v 24bitových barvách byly vyhodnoceny pomocí softwaru NIS Elements AR3.22.05 (Laboratory Imaging) s modulem Root Analyzer. Byly sledovány tyto parametry: délka kořenového systému, délka hlavního kořene, délka postranních kořenů, počet postranních kořenů prvního a druhého řádu, poměr délky postranních kořenů a kořene hlavního, počet postranních kořenů na cm hlavního kořene a průměrná délka postranních kořenů. Pro stanovení celkové produkce biomasy byly rostliny po 16 dnech rozděleny na nadzemní část a kořeny. Každá část byla zabalena do předváženého alobalu a její čerstvá hmotnost byla zvážena. Zabalené části rostlin byly umístěny na 3 dny do sušárny vyhřáté na 65 °C a poté byla zvážena suchá hmotnost rostlinných částí. Z čerstvé hmotnosti (ČH) a suché hmotnosti (SH) byl vypočítán relativní obsah vody (RWC, relative water content) v nadzemní části podle vzorce: $RWC = \frac{\check{C}H - SH}{\check{C}H}$, rovněž byl vypočítán poměr suchých hmotností kořene a nadzemní části (R/S poměr).

3.6 Mikroskopická analýza meristémů kořenů *kup9*

Rostliny byly kultivovány *in vitro*, jak je popsáno v kapitole 3.4. Desátý den byly odděleny nadzemní části a kořeny byly po jednom vloženy do jamek kultivační destičky. Každý kořen byl fixován 3 ml 4% formaldehydu rozpuštěného ve fosfátovém pufru pH = 7,2. Takto byly kořeny skladovány 3 dny při 4 °C. Poté byla fixáž nahrazena 3 ml fosfátového pufru pH = 7,0 a kořeny byly pomocí vakuové pumpy 1 h odvzdušňovány. V dalším kroku byl vyměněn fosfátový pufr a kořeny byly 15 min promývány. Fosfátový pufr byl odsát a byly přidány 3 ml 30% glycerolu s 2% DMSO, který působil 30 min. Předchozí roztok byl odsát a byly přidány 3 ml 50% glycerolu s 0,1% tritonem na 30 min. Roztok byl nahrazen 3 ml 65% glycerolu s 2% DMSO po dobu 30 min.

Bylo připraveno dostatečné množství podložních skel, na které byly nalepeny dva proužky parafilmu. Krycí sklo tak leží na těchto proužcích a nemůže poničit kořeny.

Na sklíčka bylo kápnuto 150 µl projasňovacího roztoku (Dubrovsky et al., 2009) s přidavkem Hoechstova barviva, pro barvení buněčných jader, a propidium jodidu, pro barvení buněčných stěn. Pomocí štětečků byly jednotlivé kořeny přemístěny na sklíčka a rovnoměrně rozprostřeny.

Projasňovací roztok byl připraven rozpuštěním 0,04 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v 20 ml 65% glycerolu. Po jeho rozpuštění bylo přidáno 17 g NaI a 0,4 ml DMSO. Do hotového projasňovacího roztoku byla přidána fluorescenční barviva. Hoechstovo barvivum v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a propidium jodid v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Preparáty byly pozorovány v diferenciálním interferenčním kontrastu na mikroskopu (Research Microscope BX51, Olympus) a snímány připojenou kamerou Apogee Alta U4000 CCD Camera (Apogee Instruments inc). Pozorována byla anatomie kořene s důrazem na meristémy hlavních a postranních kořenů a elongační zónu těchto kořenů. Fotografie meristémů postranních kořenů byly vždy nasnímány pro 1. a 5. nejstarší postranní kořen.

Fluorescenční barvení bylo pozorováno na konfokálním mikroskopu LSM 800 (Zeiss) na pracovišti Ústavu experimentální botaniky v Lysolajích. Fotografie zachycující jednotlivé optické řezy meristémy postranních kořenů byly vždy nasnímány pro 1. a 5. nejstarší postranní kořen.

3.7 Odolnost rostlin k suchu

Za účelem otestovat odolnost jednotlivých linií k stresu suchem byly rostliny pěstovány v plastových květináčích o rozměrech 5x5 cm na směsi kompostové zeminy sterilizované propařením s křemítkem v poměru 2:1. Každý květináč byl naplněn přibližně stejným množstvím substrátu. Poté byly květináče ponechány 5 h v zálivce a byla zvážena jejich počáteční hmotnost po nasycení vodou. Do každého květináče byla rovnoměrně vyseta 4 semena. Pro každou linii bylo osázeno 13 květináčů. Semena byla povrchově sterilizována, jak je popsáno v kapitole 3.1.2. V první části experimentu byly květináče těsně u sebe v minipařeništích (Minipa, Fima) zalévány pravidelně 700 ml vodovodní vody na pařeniště jednou za dva dny. Takto byly kultivovány v místnosti s teplotou 23°C, relativní vlhkostí 45 %, fotoperiodou 16 h světlo a 8 hodin tma a ozářeností v úrovni rostlin 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 24 dní. Po této době byly květináče opět zváženy, aby bylo možno vyloučit výrazně odlišné vysychání některých květináčů. Pro stanovení produkce biomasy a obsahu vody byly z pěti květináčů od každé linie odebrány nadzemní části rostlin a zpracovány, jak je popsáno v kapitole 3.5. Zbylé květináče byly náhodně rozmístěny na 2 fotomisky a přemístěny do kultivační místnosti s teplotou 25 °C, relativní vlhkostí 55%, fotoperiodou 16 h světlo a 8 h tma a ozářeností v úrovni rostlin 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kde již nebyly zalévány (viz obrázek 11). Květináče byly každý den váženy, aby bylo možno vyloučit jejich rozdílné vysychání. Po čtyřech dnech bez zálivky bylo na mnoha rostlinách patrné vadnutí a všechny rostliny byly proto sklizeny způsobem, který je popsán výše v této kapitole a navíc byla každé rostlině změřena délka květního stvolu.

Obrázek 11: Uspořádání kultivace bez zálivky.



3.8 Akumulace radioizotopu ^{134}Cs

Rostliny byly pěstovány hydroponicky na zhotovených mirelonových nosnících. Kultivační média byla odvozena od 0,2x MS média (Murashige a Skoog, 1962). pH médií bylo upraveno NaOH na přibližnou hodnotu 5,6.

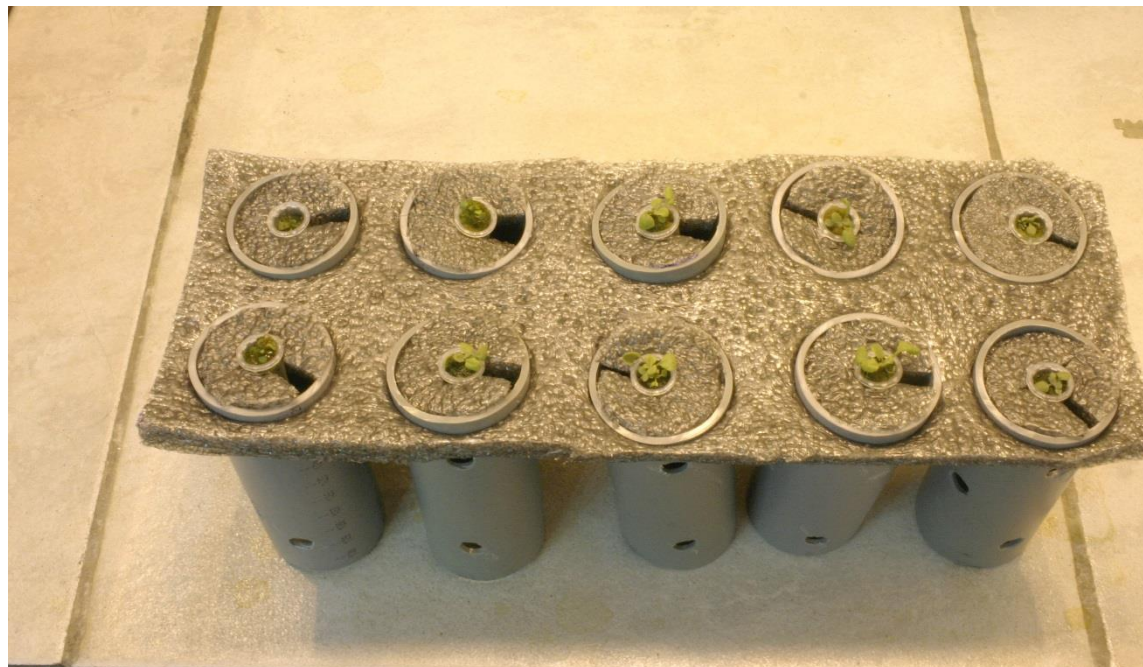
3.8.1 Zhotovení nosníků

Pro první část kultivace, byly zhotoveny nosníky tak, že do mirelonových desek, bylo rovnoměrně vyříznuto dvacet otvorů o průměru 0,5 cm. Do otvorů byly umístěny plastové zkumavky s odstříženými víčky a zúženými částmi (dny). Poté byly otvory vyplněny čedičovou vatou.

Pro druhou část kultivace byly zhotoveny nosníky s nástavci oddělujícími kořenové systémy. Do mirelonových desek bylo vyříznuto deset otvorů o průměru 4,5 cm. Byly připraveny 10 cm dlouhé kusy polyetylenových trubek o průměru 5 cm. Do každého kusu bylo vyvrtáno 5 děr o průměru 0,5 cm pro zabezpečení volné difúze média do okolí kořenů. Tyto kusy byly umístěny do otvorů

v deskách, kde spolehlivě držely. Do vyříznutých mirelonových koleček, byl vyříznut otvor pro plastovou zkumavku s čedičovou vatou a těmito kolečky byly trubky zazátkovány (viz obrázek 12).

Obrázek 12: Zhotovený nosník s nástavci.



3.8.2 Předpěstování rostlin

Na začátku kultivace bylo na mirelonové nosníky vyseto 20 semen od každé linie. Semena byla povrchově sterilizována, jak je popsáno v kapitole 3.1.1. Nosníky byly umístěny po dvou v polyetylenových kultivačních nádobách obsahujících 12 l okysličeného kontrolního média bez NH_4 (viz tabulka 18). Kultivace probíhala v uzavřené místnosti s teplotou 25 °C, relativní vlhkostí 55 %, fotoperiodou 16 h světlo a 8 h tma a ozářeností v úrovni rostlin $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po 2 týdnech bylo 10 nejvitálnějších rostlin přesazeno na nosníky opatřené nástavci, které bránily zamotání kořenových systémů mezi sebou. Nosníky byly umístěny do akvárií s 5 l okysličeného kontrolního média, stěny akvária byly potaženy černou folií bránící pronikání světla ke kořenům. Takto byly rostliny kultivovány 1 týden. Poté byly rostliny převezeny na Státní ústav radiační ochrany (SÚRO). Pro nakládání s transgenními rostlinami má SÚRO platné povolení v režimu uzavřeného nakládání dle §16 odst. 2 zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, na základě oznámení MŽP č.j. 38254/ENV/14, ze dne 29. května 2014. Transport rostlin na SÚRO probíhal v souladu s tímto povolením. Na SÚRO byly rostliny pěstovány v kultivačním boxu (Q Cell 1400/40) při 24 °C, relativní vlhkosti 50%, fotoperiodě 16

h světlo a 8 h tma a ozáření v úrovni rostlin $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz obrázek 13). Následující týden byly rostliny kultivovány na stresovém médiu s nedostatkem draslíku bez NH_4^+ (viz tabulka 18).

3.8.3 Kultivace se ^{134}Cs a měření aktivity

Čtyřtydenní rostliny byly přeneseny na roztok obsahující 1 mM CsCl, značený 1800 Bq/l radioaktivního $^{134}\text{CsCl}$ a 0,5 mM CaCl_2 na 24 h. Poté byly rostliny přeneseny na 2 min do roztoku obsahujícího 1 mM neznačeného CsCl a 0,5 mM CaCl_2 pro vymytí radioaktivního cesia z apoplastu. Následně byly rostliny rozděleny na nadzemní část a kořeny. Kořeny byly osušeny ubrousky a obě části byly poté sušeny 3 dny při 60°C . Suché vzorky byly dále zpracovávány pracovníky SÚRO ing. Terezou Ježkovou a ing. Petrem Rulíkem. Vzorky byly zváženy a poté byly umístěny ke dnu plastové zkušavky, u kterého byly drženy zátkou (viz obrázek 14). Stanovení obsahu ^{134}Cs bylo provedeno metodou spektrometrie gama pro energie gama částic 569 keV, 604 keV a 795 keV. Byl použit studnový detektor vyrobený na zakázku SÚRO (viz obrázek 15), kde je v germaniovém detektoru vysoustružen malý otvor, do něž se vkládá vzorek (viz obrázek 16), relativní účinnost tohoto detektoru je 18,5 %. Byla použita geometrie měření pro bod na dně zkušavky. Podmínku bodového zdroje nelze principiálně dodržet, při výpočtu nejistoty měření byla uvažována nejistota spojená s přípravou vzorku 5 %.

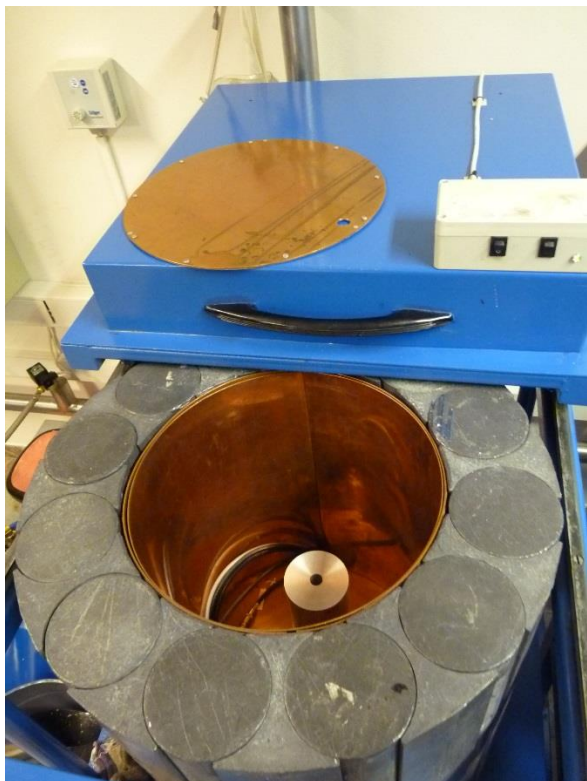
Obrázek 13: Kultivace na SÚRO



Obrázek 14: Vzorky připravené pro měření



Obrázek 15: Studnový detektor



Autorkou fotografií je ing. Tereza Ježková ze SÚRO

Obrázek 16: Vzorek v detektoru



3.9 Křížení linií

Rostliny inzerčních linií byly kultivovány, jak je popsáno v kapitole 3.1.1 až do fáze, kdy na stvolu bylo několik vyvinutých šesulí. U mateřské rostliny byly odstraněny všechny vyvinuté šesule a otevřené květy, z poupate bylo ponecháno pouze jedno poupě těsně před otevřením. Za pomoci binolupy a hodinářských pinzet byly z poupěte odstraněny všechny květní části vyjma pestíku. Byla provedena kontrola, zda pestík ani stonek nejeví známky výrazného poškození při předešlé manipulaci.

Z otcovské rostliny byla odebrána tyčinka z právě otevřeného květu. Pyl této tyčinky byl nanesen na obnažený pestík. Mateřská rostlina byla vrácena do kultivační místnosti a pestík byl překryt igelitovým sáčkem po 3 dny. Po plném vyvinutí šesule, byla tato ustřížena a po jejím uschnutí z ní byla vypreparována semena F1 generace. Semena byla povrchově sterilizována a vyseta, jak je popsáno v kapitole 3.1.1. Z vyvinutých rostlin F1 generace byla sesbírána semena a rostliny F2 generace byly opět kultivovány, jak je popsáno v kapitole 3.1.1. Z listů těchto rostlin byla vyizolována DNA, jak je popsáno v kapitole 3.2.1. Přítomnost inzerční T-DNA v obou alelách genů byla ověřována PCR (viz kapitolu 3.3).

3.10 Transformace *A. thaliana* konstruktem KUP9::*GUS*

3.10.1 Plazmidy

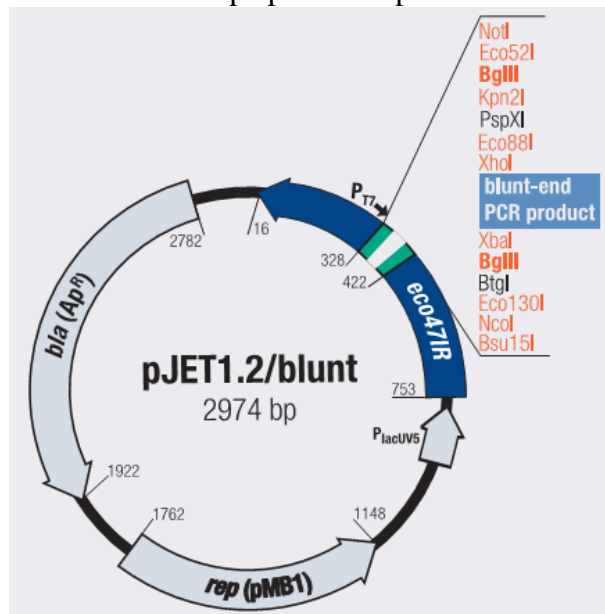
pJET1.2

pJET1.2 (Thermo Scientific) je lineární plazmid vhodný pro klonování PCR produktů s tupými konci. Obsahuje gen rezistence proti antibiotiku ampicilin (viz obrázek 17).

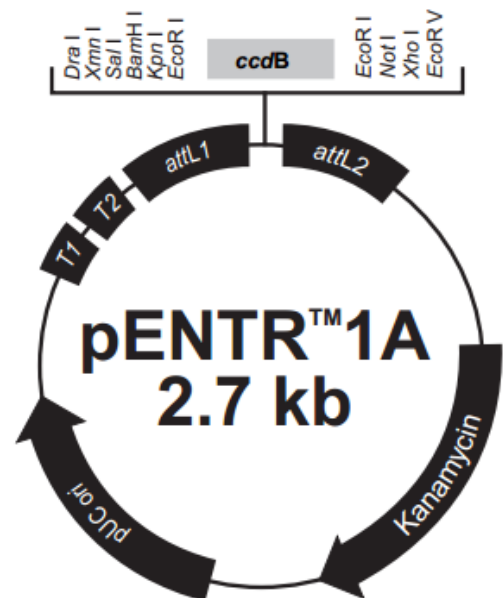
pENTR1A

pENTR1A (Thermo Scientific) je cyklický plazmid systému Gateway® vhodný pro klonování fragmentů DNA s lepivými konci. Jeho sekvence obsahuje attL1 a attL2 oblast, které jsou rozpoznávány klonázou a umožňují efektivní zabudování fragmentu do cílového vektoru. Plazmid obsahuje dva geny rezistence k antibiotikům (viz obrázek 18). Kanamycinová rezistence je používána pro selekci transformovaných bakterií, chloramfenikolová rezistence je štěpením vektoru eliminována a citlivost transformovaných bakterií ke chloramfenikolu, může být použita pro ověření transformace. Vyštěpená sekvence rovněž obsahuje *ccdB* gen, který blokuje funkci DNA gyrázy, a tím zabíjí buňky transformované neštěpeným plazmidem.

Obrázek 17: Mapa plazmidu pJET1.2



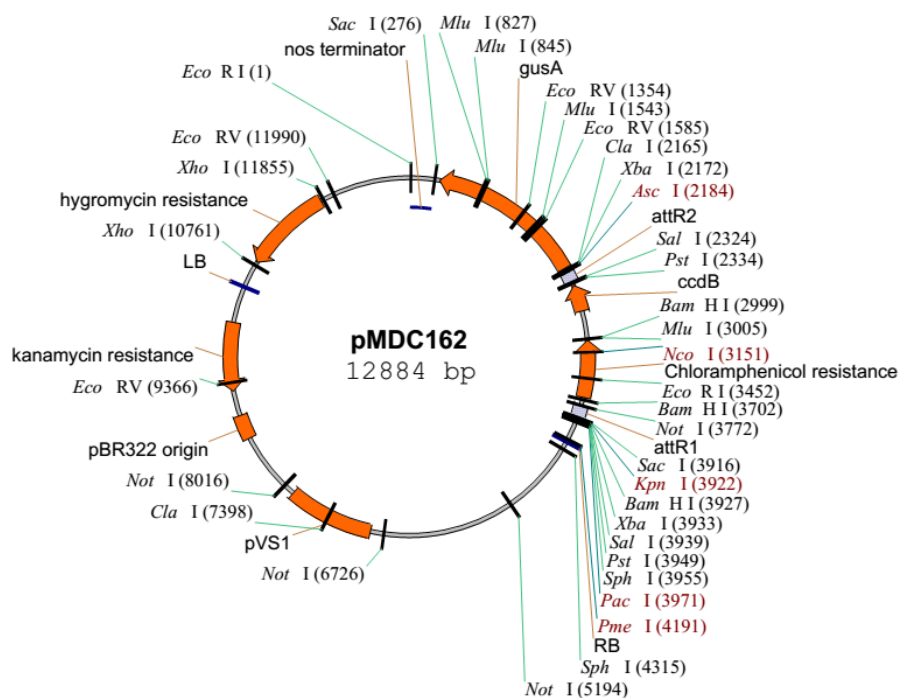
Obrázek 18: Mapa plazmidu pENTR1A



pMDC162

pMDC162 je cyklický plazmid obsahující attR1 a attR2 sekvenci, díky kterým může být recipientem klonovaného fragmentu v klonázové reakci. Ke klonovanému fragmentu je připojen reportérový gen pro glukuronidázu (*gusA*). Sekvence plazmidu obsahuje geny rezistence k antibiotikům kanamycinu a hygromycinu, vyštepovaná sekvence obsahuje gen rezistence ke chloramfenikolu a *ccdB* gen (viz obrázek 19).

Obrázek 19: Mapa plazmidu pMDC162



3.10.2 Postup práce

Přípravné práce

Sekvence transportéru KUP9 s 3 kbp promotorové oblasti byla opatřena pomocí veřejně přístupné aplikace (<http://signal.salk.edu/isect.2.html>). Za účelem amplifikace promotoru transportéru KUP9 byl navržen převrácený komplementární primer, který komplementuje s úsekem promotoru přímo před startovacím kodonem. Prostřednictvím veřejně přístupné aplikace (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) byl vybrán přímý primer, který splňoval požadavky minimálního tvoření vlásenkové struktury, minimálního párování s navrženým primerem a délky syntetizovaného úseku blíží se 2500 bp. K 5' koncům primerů byly přidány adaptory obsahující NotI respektive KpnI restriční místa a dvě další báze pro zajištění efektivity štěpení poblíž konce fragmentu. Konečné sekvence primerů shrnuje tabulka 19. Celý postup práce s DNA

byl nejprve proveden *in silico* v programu Geneious (Biomatters), který byl rovněž používán pro navrhování kontrolních štěpení plazmidů.

Tabulka 19: Primery použité pro amplifikaci s vyznačenými restrikčními místy

Primer	Sekvence
KpnIpKUP9 - přímý	CCGGTACCagactgaggcggaaaa
NotIpKUP9 - převrácený	AAGCGGCCGCaacaaaagaactcgaaattcc

Amplifikace a vnesení do bakterií

Promotorová sekvence byla amplifikována PCR (viz kapitolu 3.2.5). Pro ověření výsledku reakce byla s celým jejím objemem provedena agarózová gelová elektroforéza (viz kapitolu 3.2.6). Gel obsahující fragment DNA o délce 2,5 kbp byl vyříznut čistým skalpelem a byla z něj purifikována DNA pomocí High Pure PCR Purification Kit (Roche). Purifikovaná DNA byla použita do ligační reakce s plazmidem pJET1.2 (viz tabulka 20). Reakce byla inkubována 30 min při 22 °C. Po skončení bylo k reakci přidáno 10 µl chloroformu a směs byla promíchána. Směs byla odstředována 5 min při 14000 ot/min a poté byla horní vodná fáze odebrána do nové zkumavky.

Tabulka 20: Složení ligační reakce

Komponenta	Objem (µl)
pKUP9	1
pJET1.2	3
2x reakční pufr	5
T4 DNA ligáza	1

Produkt reakce byl elektroporován do *E. coli* (viz kapitolu 3.2.9) bakterie byly poté selektovány ampicilinem (50 µg/ml). Z náhodně vybraných kolonií byla provedena PCR, jak je popsáno v kapitole 3.2.4. Pozitivně testované kolonie byly párátkem přeneseny do 3 ml LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a kultivovány přes noc v třepačce při 37 °C. Z bakteriální kultury byl purifikován plazmid pomocí kitu Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Purifikovaný plazmid byl kontrolně štěpen enzymy NcoI a EcoRI (NEB) jak je popsáno v kapitole 3.2.8. Promotorový úsek byl sekvenován v Laboratoři sekvenování DNA Přírodovědecké fakulty (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) za použití přímého a převráceného primeru dodávaného s vektorem a dvou dalších vlastních přímých primerů (viz tabulka 21).

Tabulka 21: Sekvence sekvenačních primerů

Primer	Sekvence
pJET1.2 forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
KUP9seq1	TTGAACTACAAAACCTATGGTCAAAA
KUP9seq2	TGAGTCAATGGCCTTAATATTTGA
pJET1.2 reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

Vnesení promotoru do vstupního vektoru Gateway

Z pozitivně testovaného plazmidu byl enzymy KpnI a NotI (NEB), vyštěpen promotor *KUP9* stejnými enzymy byl štěpen plazmid pENTR. Reakce byly uspořádány, jak je popsáno v kapitole 3.2.8. Produkty reakce byly rozděleny agarózovou gelovou elektroforézou (viz kapitolu 3.2.6) a gely obsahující promotorovou DNA a rozštěpený pENTR byly vyříznuty čistým skalpelem a pomocí High Pure PCR Purification Kit (Roche) z nich byla purifikována DNA. 2 µl purifikovaných fragmentů DNA byly použity pro elektroforézu za účelem odhadu jejich koncentrace.

Purifikované fragmenty DNA byly použity v ligační reakci, která obsahovala 0,5 µl T4 DNA ligázy (NEB), 1 µl 10x T4 DNA ligázového pufru, plazmidovou DNA a promotorový úsek DNA. Objemy přidaných roztoků s fragmenty DNA byly upraveny tak aby koncentrace promotorového úseku byla alespoň třikrát větší než plazmidové DNA a celkový objem dosáhl 10 µl. Ligační reakce byla inkubována při 14 °C přes noc. Druhý den bylo k reakci přidáno 10 µl chloroformu a směs byla promíchána. Směs byla odstředována 5 min při 14000 ot/min. Horní vodní fáze byla odebrána do nové zkumavky.

Produkt reakce byl elektroporován do *E.coli* (viz kapitolu 3.2.9) a bakterie byly poté selektovány kanamycinem (100 µg/ml). Z náhodně vybraných kolonií byla provedena PCR, jak je popsáno v kapitole 3.2.4. Pozitivně testované kolonie byly párátkem přeneseny do 3 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a kultivovány přes noc v třepačce při 37 °C. Z bakteriální kultury byl purifikován plazmid pomocí kitu Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Purifikovaný plazmid byl kontrolně štěpen enzymy Sall a PvuII (NEB).

Vnesení plazmidu do cílového vektoru Gateway

1 µl pozitivně testovaného plazmidu byl použit v klonázové reakci, která obsahovala 1 µl pMDC162, 1 µl L/R klonázy (Invitrogen) a 2 µl TE pufru. Reakce byla inkubována přes noc při 25 °C. Druhý den bylo k reakci přidáno 0,5 µl proteinázy K a reakce byla inkubována 10 min při 37 °C.

Produkt reakce byl elektroporován do *E. coli* jak je popsáno v kapitole 3.2.9, bakterie byly selektovány kanamycinem (100 µg/ml) a hygromycinem (100 µg/ml). Z náhodně vybraných kolonií byla provedena PCR, jak je popsáno v kapitole 3.2.4. Pozitivně testované kolonie byly párátkem přeneseny do 3 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a hygromycinem (50 µg/ml) a kultivovány přes noc v třepačce při 37 °C. Z bakteriální kultury byl purifikován plazmid pomocí kitu Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Purifikovaný plazmid byl kontrolně štěpen enzymem NotI (NEB).

Transformace rostlin metodou floral dip

Plazmid byl elktroporován do *A. tumefaciens* (viz kapitolu 3.2.9) a bakterie byly následně selektovány rifampicinem (100 µg/ml), gentamicinem (25 µg/ml) a kanamycinem (100 µg/ml). Z vybraných kolonií byla provedena PCR (viz kapitolu 3.2.4). Pozitivně testované kolonie byly párátkem přeneseny do 3 ml LB média s rifampicinem (100 µg/ml), gentamicinem (25 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml) a suspenze byla kultivována 24 h na třepačce při 28 °C a 180 kmitů/min. Po této době byla kultivace přelita do 50 ml LB média se stejnými antibiotiky a kultivována 48 h stejným způsobem.

Suspenze bakterií byla poté odstředována 20 min při 5000 otáčkách/min. Pelet bakterií byl resuspendován v 20 ml 5% roztoku sacharózy s 0,01 % smáčedla Silwet. Vyvíjející se poupata celkem 12 rostlin byla máčena v bakteriální suspenzi přibližně 30 s.

Selekce transformovaných semen

Semena namáčených rostlin byla sesbírána a v exikátoru byla sterilizována 4 h plynným chlorem, který byl vyvíjen ze směsi 50 ml roztoku NaClO (SAVO) a 1,5 ml koncentrované HCl. Semena poté byla nasypána na Petriho misky obsahující 0,2xMS médium s 1% agarózou, 1% sacharózou a 50 µg/ml hygromycinu. Misky byly 3 dny skladovány ve tmě při 4 °C a poté byly kultivovány, jak je popsáno v kapitole 3.4.

3.11 Statistické zpracování výsledků

Data z kultivačních experimentů často nesplňovala kritéria normálního rozdělení ani po transformaci odmocněním nebo logaritmováním, proto byly pokud možno používány neparametrické testy.

Pro porovnávání více linií při různých kultivačních podmínkách v kapitole 4.2 byla použita dvou výběrová ANOVA a Tukey-Kramerův test pro vyhodnocení interakcí obou faktorů. Tukey-Kramerův test se hodí na porovnání dvou datových souborů se stejným rozptylem, tuto podmínku data splňovala.

Pro porovnávání více linií při stejných kultivačních podmínkách v kapitolách 4.4 a 4.5 byla použita jednovýběrová ANOVA s neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem.

Pro porovnání dvou linií při stejných podmínkách v kapitole 4.2 byl použit dvou výběrový T-test s neparametrickým Mann-Whitneyovým testem.

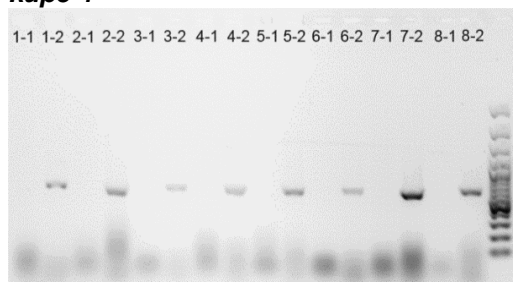
4 Výsledky

4.1 Ověření homozygotních inzerčních mutantů

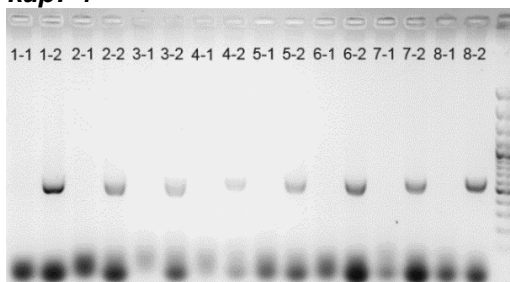
Pro každou T-DNA inzerční linii byla ověřena přítomnost inzerce v obou alelách genu pomocí PCR. Bylo testováno 7 – 8 rostlin pro každou linii a krom jednoho případu nebyla nalezena žádná kontaminace rostlinou netransformovanou nebo heterozygotní (viz obrázek 20). Pro další experimenty byla používána pouze semena sesbíraná z pozitivně testovaných rostlin.

Obr. 20: Nasnímané agarózové gely s produkty reakcí. První číslo v popisku dráhy označuje rostlinu, druhé reakci: 1 – Produkt v nepřítomnosti inzerce v lokusu, 2 – produkt za přítomnosti inzerce v lokusu.

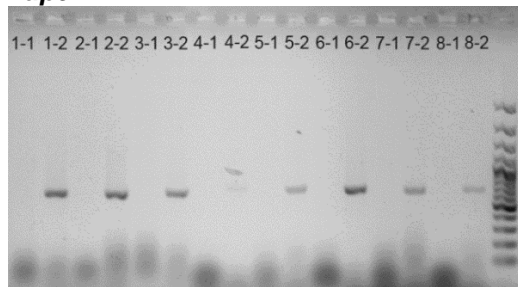
kup5-1



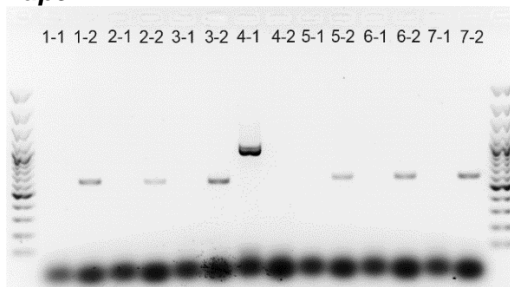
kup7-1



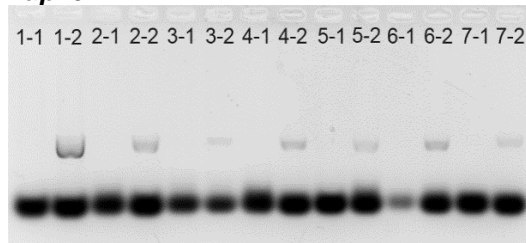
kup9-1



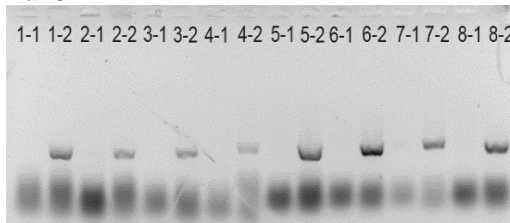
kup9-2



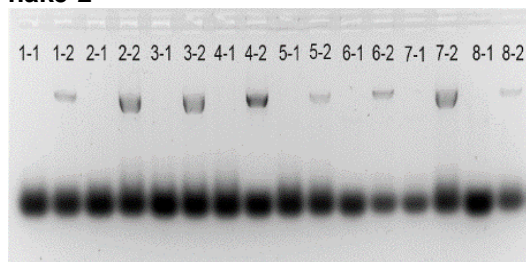
kup10-1



hak5-1



hak5-2



4.2 Růstové parametry T-DNA inzerčních linií.

Růstové parametry inzerčních linií, sledující produkci biomasy v prýtu a v kořeni a architekturu kořenového systému, byly sledovány ve čtyřech nezávislých kultivacích. V první kultivaci byly rostliny pěstovány na médiích s vysokou (4 mM), nebo nízkou (1 μ M) dostupností K^+ . Dále byla média rozdělena na varianty s obsahem NH_4Cl (4 mM) a bez něj. V dalších třech kultivacích byla uplatněna pouze média s rozdílnou koncentrací K^+ bez obsahu NH_4Cl .

4.2.1 Kultivace 1: Vliv K^+ a NH_4^+

V této pilotní kultivaci byly srovnávány linie pro všechny studované přenašeče, konkrétně: *kup5-1*, *kup7-1*, *kup9-1*, *kup10-1*, *hak5-1* (viz souhrnnou tabulku 16). Jako kontrolní genotyp byla použita Col-0 (N60000). Pro každou testovanou kombinaci genotypu a média bylo vysazeno 10 semen. Vzhledem k nehomogenní klíčivosti byl počet hodnocených rostlin pro každou kombinaci $n = 6 - 10$. Pro Col-0 ve variantě s přidaným NH_4^+ nejsou výsledky uváděny z důvodu kontaminace kultivace.

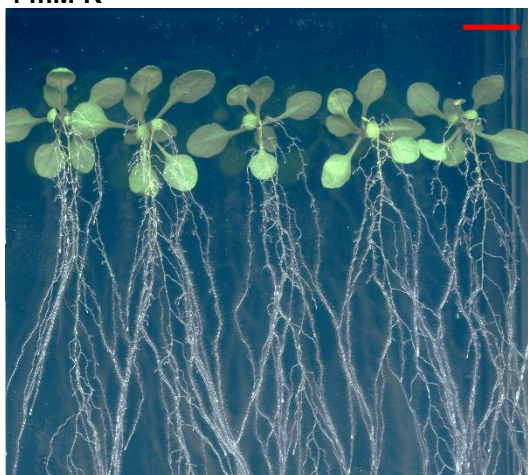
Linie *hak5-1* produkovala signifikantně více biomasy než Col-0 při dostatku K^+ . V důsledku toho měla i signifikantně zvýšené některé parametry architektury kořenového systému. Takovýto benefiční fenotyp zcela odporuje publikovaným informacím o *hak5-1* a v textu této kapitoly mu nebude věnován větší prostor, pro možná vysvětlení viz kapitola Diskuze.

Citlivost linií k deficienci K^+

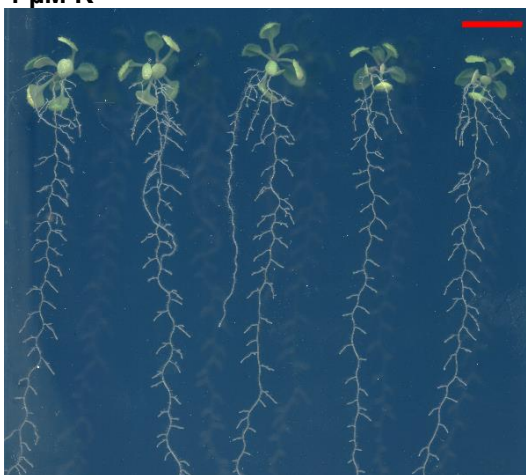
Vliv snížené koncentrace K^+ byl jasně patrný u všech linií. Stresované rostliny měly značně redukovanou suchou i čerstvou hmotnost prýtu a kořene a jejich listy znatelně žlutly (viz obrázek 21, grafy 1, 2, 5 a 6). Rozdíly v produkci nadzemní i podzemní biomasy v závislosti na dostupnosti K^+ jsou statisticky významné ($p < 0,001$). Statisticky významné rozdíly lze pozorovat téměř u všech linií. Nízká dostupnost K^+ rovněž snižuje relativní obsah vody v prýtu rostlin. Rostliny, které nebyly vystaveny NH_4^+ mají obsah vody výrazně snížený (viz graf 4, $p < 0,001$), s výjimkou Col-0 jsou tyto rozdíly statisticky signifikantní u všech linií. U rostlin vystavených NH_4^+ je toto snížení statisticky neprůkazné (viz graf 3).

Obrázek 21: Vzhled rostlin po 16 dnech kultivace na příkladu linie Col-0

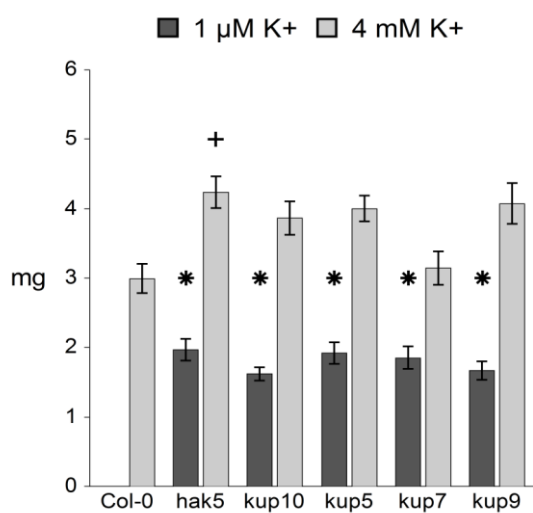
4 mM K⁺



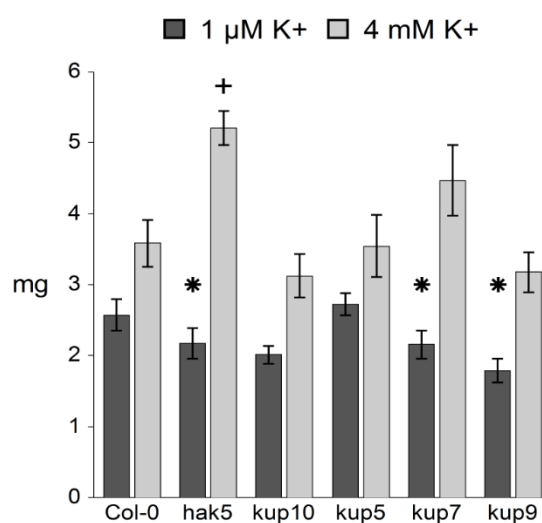
1 μM K⁺



Graf 1: Suchá hmotnost prýtů (+ NH₄⁺)

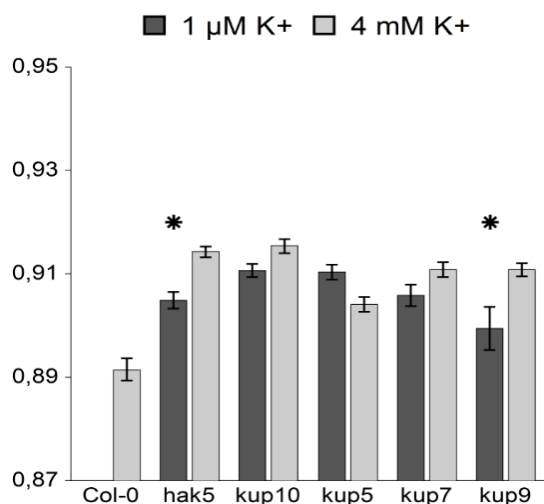


Graf 2: Suchá hmotnost prýtů (- NH₄⁺)

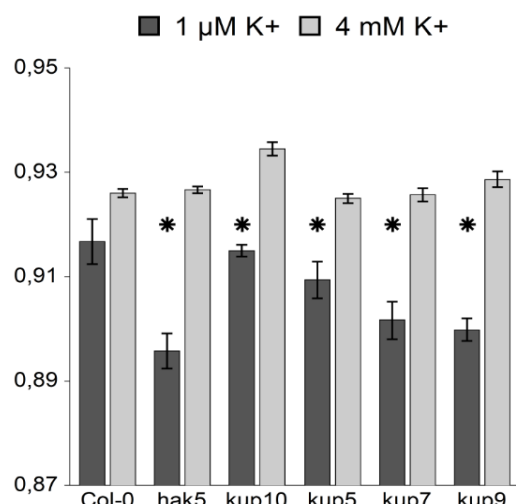


Grafy 1,2: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, p < 0,05)
Úsečky v obrázcích reprezentují 1 cm

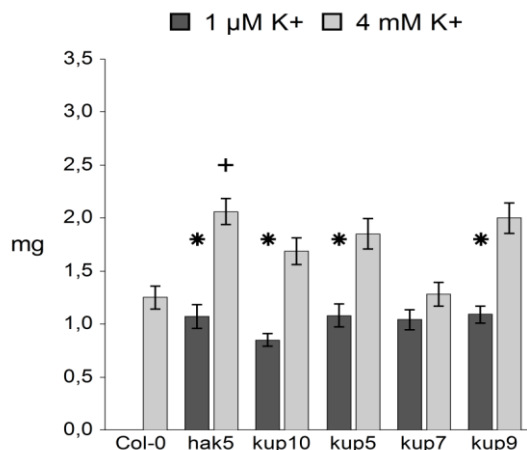
Graf 3: Relativní obsah vody v prýtu rostlin (+ NH₄⁺)



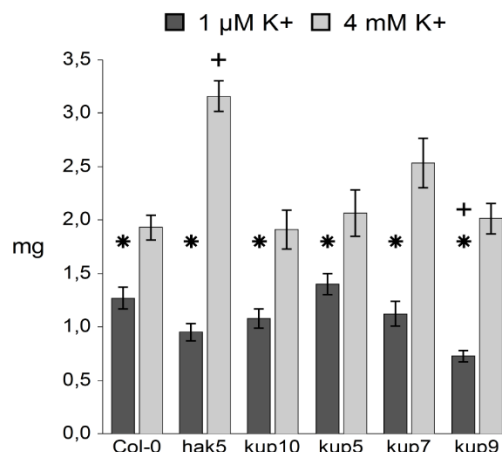
Graf 4: Relativní obsah vody v prýtu rostlin (- NH₄⁺)



Graf 5: Suchá hmotnost kořenů (+ NH₄⁺)



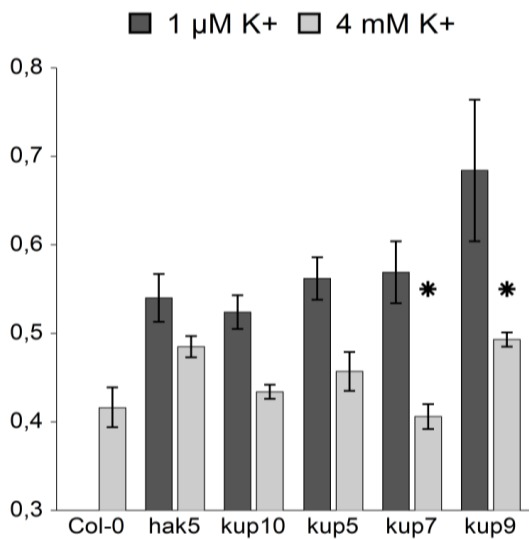
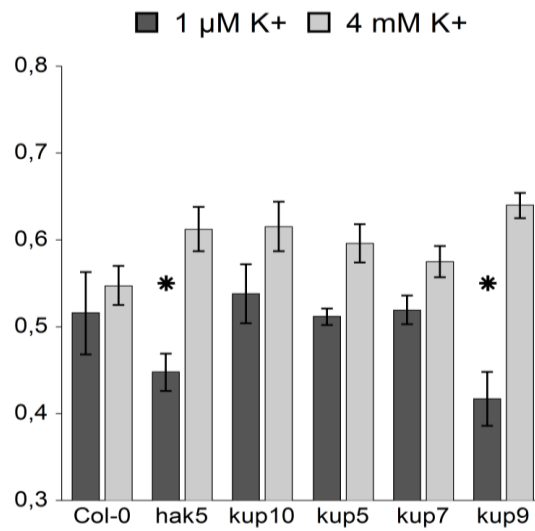
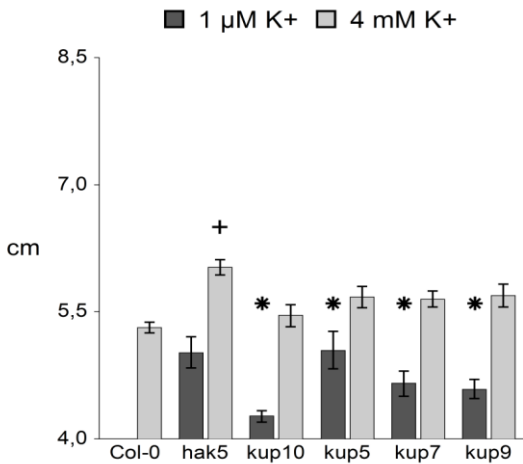
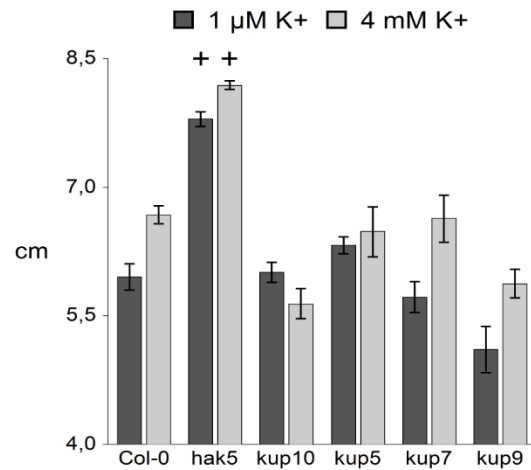
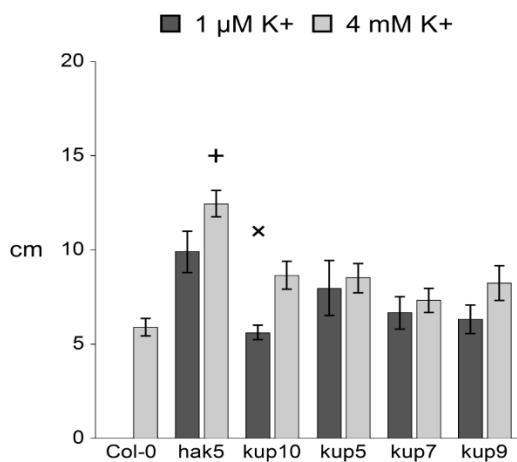
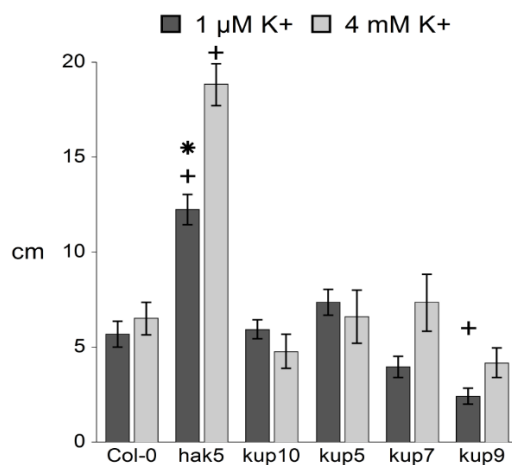
Graf 6: Suchá hmotnost kořenů (- NH₄⁺)



Grafy 3 - 6: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)
+ značí signifikantní rozdíl oproti Col-0 v dané variantě výživy (T-test, $p < 0,05$)

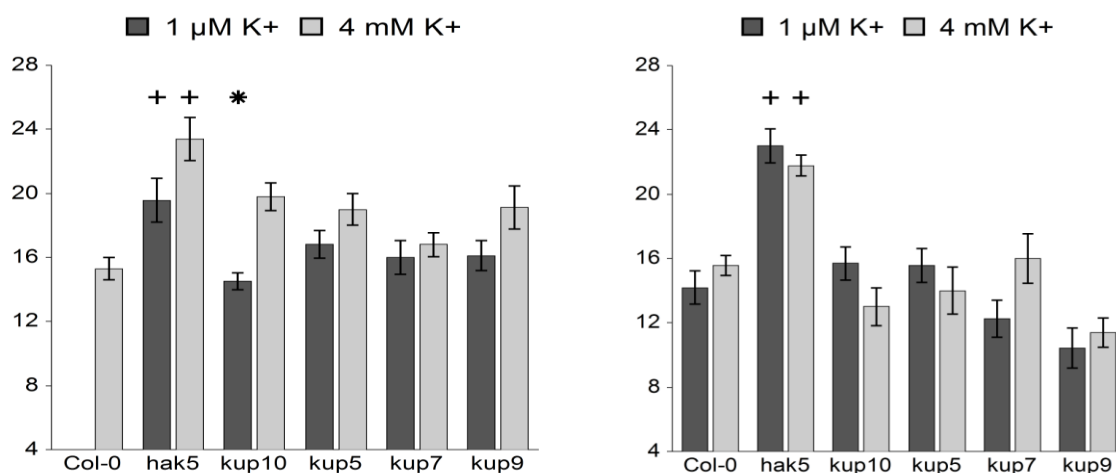
R/S poměr byl dostupností K⁺ ovlivněn v závislosti na NH₄⁺. U rostlin vystavených NH₄⁺ byl tento poměr vyšší při nedostatku K⁺ (viz graf 7, $p < 0,001$). Pro jednotlivé linie je tento rozdíl statisticky signifikantní jen u *kup7* a *kup9*. U rostlin nevystavených NH₄⁺ můžeme pozorovat opačný trend (viz graf 8, $p < 0,001$), avšak signifikantní je rozdíl jen pro linie *kup9* a *hak5*.

Vezmeme-li v potaz všechny rostliny v pokusném vzorku tak snížená dostupnost K⁺ ovlivňuje architekturu kořenového systému. Stresované rostliny zakládají méně postranních kořenů a jejich hlavní i postranní kořeny jsou kratší (viz grafy 9 – 14, $p < 0,05$). U jednotlivých linií tyto rozdíly obvykle nejsou signifikantní.

Graf 7: R/S poměr (+ NH₄⁺)**Graf 8: R/S poměr (- NH₄⁺)****Graf 9: Délka hlavního kořene (+ NH₄⁺)****Graf 10: Délka hlavního kořene (- NH₄⁺)****Graf 11: Celková délka postranních kořenů (+ NH₄⁺)****Graf 12: Celková délka postranních kořenů (- NH₄⁺)**

Grafy 7 - 12: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$),
 × značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy u jedné linie (T-test, $p < 0,05$), + značí signifikantní rozdíl
 oproti Col-0 v dané variantě výživy (T-test, $p < 0,05$)

Graf 13: Počet postranních kořenů (+ NH₄⁺) **Graf 14:** Počet postranních kořenů (- NH₄⁺)



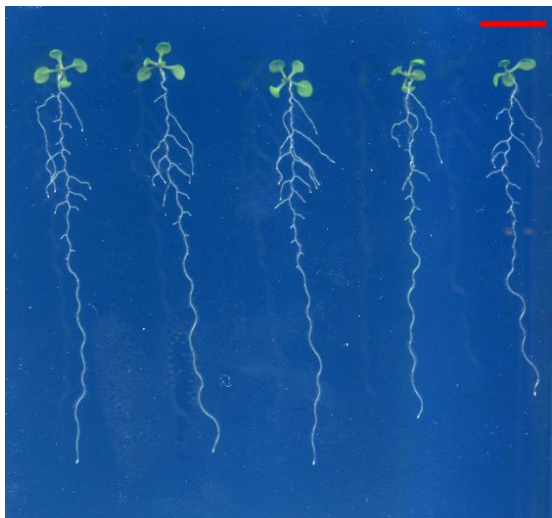
Grafy 13 a 14: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)
+ značí signifikantní rozdíl oproti Col-0 v dané variantě výživy (T-test, $p < 0,05$)

Fenotyp některých T-DNA inzerčních linií

Linie *kup9* měla sníženou suchou hmotnost kořenů při nízké koncentraci K⁺ a nepřítomnosti NH₄⁺ oproti Col-0 (viz graf 6 a 23, $p < 0,001$). Tato linie rovněž jako jediná vykazovala signifikantní snížení suché hmotnosti kořenů při odebrání NH₄⁺ (viz graf 23, $p < 0,01$). V architektuře kořenového systému se linie *kup9* signifikantně lišila od Col-0 v celkové délce kořenů, délce postranních kořenů, poměru délky postranních kořenů a délky hlavního kořene a v průměrné délce postranních kořenů (viz obrázek 22 a grafy 12, 15, 16, 17, $p < 0,01$). Ostatní linie se v těchto parametrech od Col-0 nelišily (data nejsou ukázána).

Obrázek 22: Vzhled rostlin po 10 dnech kultivace při 1 μM K⁺ (- NH₄⁺), úsečky v obrázcích reprezentují 1 cm.

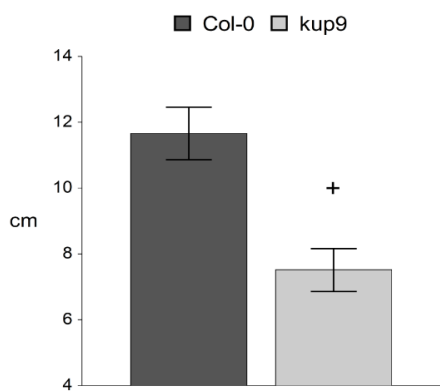
Col-0



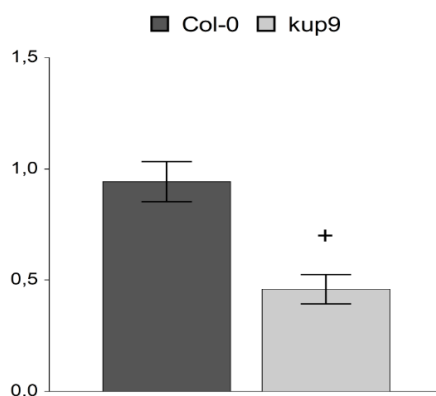
kup9



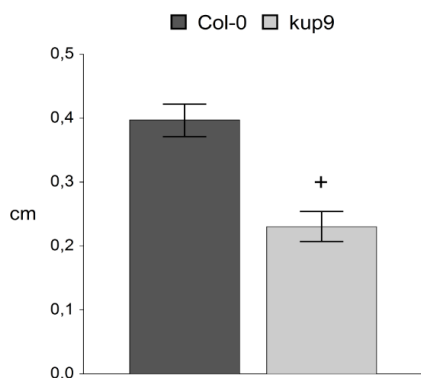
Graf 15: Celková délka kořenů (- K - NH₄⁺)



Graf 16: Poměr délky postranních kořenů a délky hlavního kořene (- K - NH₄⁺)



Graf 17: Průměrná délka postranních kořenů (- K - NH₄⁺)



Grafy 15 - 17: Průměry ± SEM, + značí signifikantní rozdíl (T-test, p < 0,05).

Další pozorovatelnou fenotypovou reakcí byla architektura kořenového systému *kup10*. Na médiu s přidaným NH₄⁺ kořenový systém této linie jako jediný signifikantně reagoval na nízkou koncentraci K⁺ ve více parametrech. Došlo ke zkrácení hlavní osy, stejně jako postranních kořenů, navíc došlo k vyvinutí menšího počtu postranních kořenů (viz obrázek 23 a grafy 9, 11 a 13, p < 0,01). V této kultivaci ovšem není k dispozici srovnání s Col-0.

Obrázek 23: Vzhled rostlin po 10 dnech kultivace při 1 μM K⁺ (+ NH₄⁺), úsečky reprezentují 1 cm.

Col-0



kup10

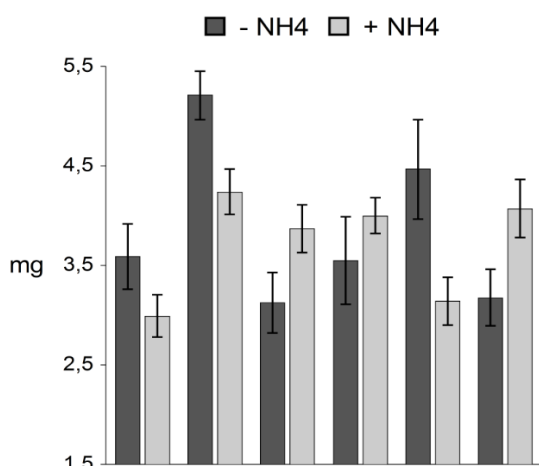


Vliv přídavku NH₄Cl do média

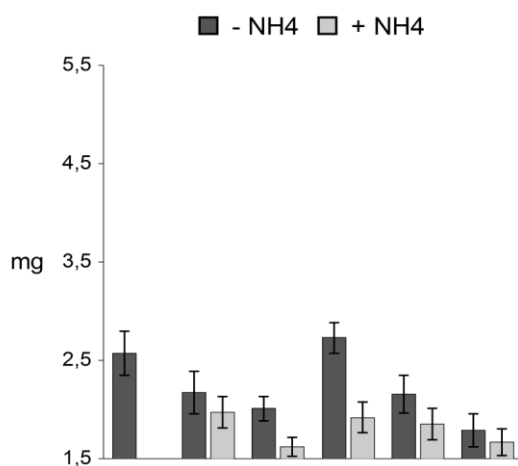
Přítomnost či nepřítomnost NH₄⁺ v médiu neovlivňovala produkci biomasy prýtu (viz grafy 18 a 19), zato ovlivňovala produkci biomasy kořenů, kde byla suchá hmotnost nižší za přítomnosti NH₄⁺ (viz graf 22 a 23, $p < 0,01$), jedná se, ale pouze o všeobecný trend, signifikantní rozdíl nalezneme jen u třech linií + K⁺. Výraznější snížení suché hmotnosti kořenů + K⁺ rostlin bylo dostačující k ovlivnění R/S poměru, který je u rostlin s dostatkem K⁺ signifikantně nižší za přítomnosti NH₄⁺ (viz graf 24, $p < 0,01$), zatímco u K⁺ stresovaných rostlin nemá NH₄⁺ vliv (viz graf 25). Jednoznačný vliv můžeme pozorovat u relativního obsahu vody v prýtu rostlin, který se za přítomnosti NH₄⁺ snižuje ($p < 0,0001$), v případě varianty zásobené draslíkem signifikantně u všech linií (viz graf 20 a 21).

Na úrovni architektury kořenového systému vedl přídavek NH₄⁺ ke zkracování hlavního kořene a k zakládání většího počtu kořenů postranních (viz grafy 26 - 29, $p < 0,001$). Ovšem tyto rozdíly nejsou vždy signifikantní pro jednotlivé linie.

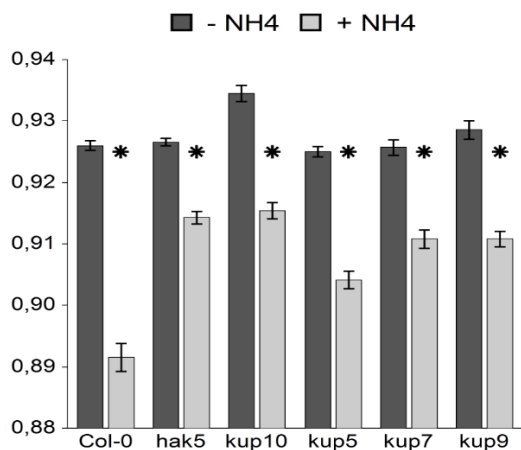
Graf 18: Suchá hmotnost prýtů (+ K⁺)



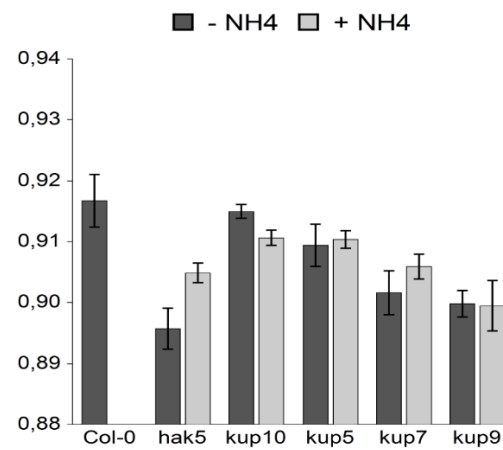
Graf 19: Suchá hmotnost prýtů (- K⁺)



Graf 20: Relativní obsah vody v prýtech (+ K⁺)

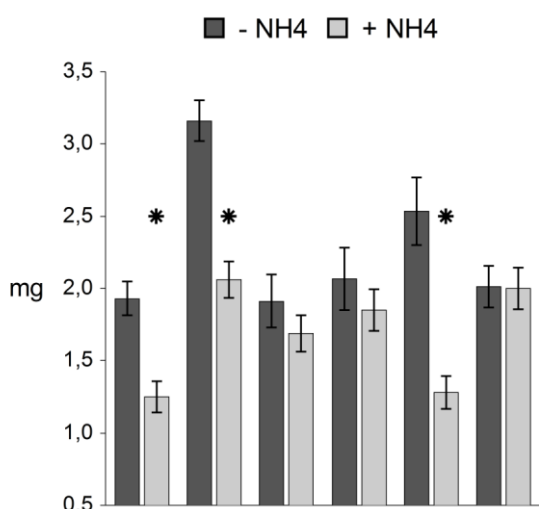


Graf 21: Relativní obsah vody v prýtech (- K⁺)

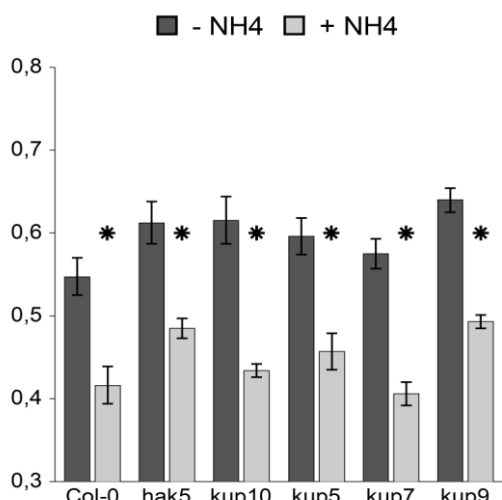


Grafy 18 - 21: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)

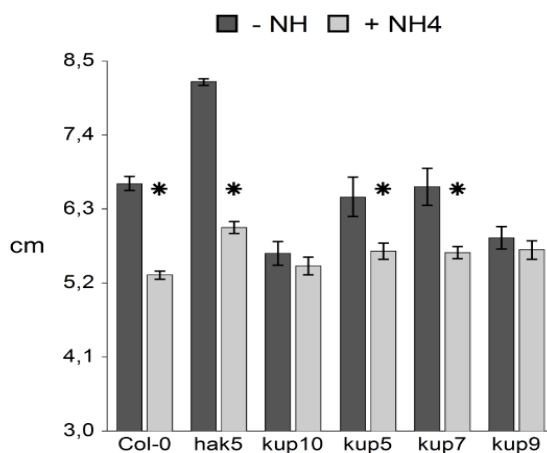
Graf 22: Suchá hmotnost kořenů (+ K⁺)



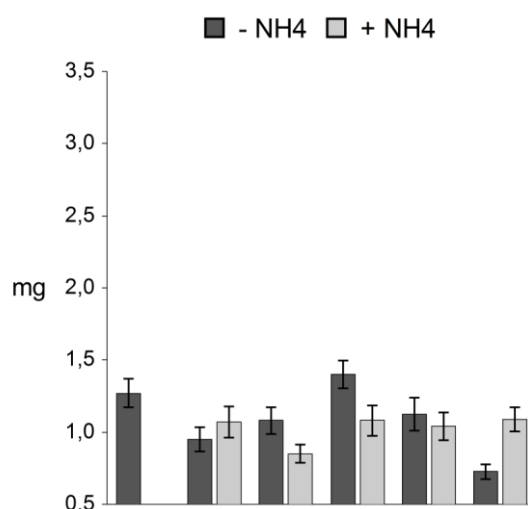
Graf 24: R/S poměr (+ K⁺)



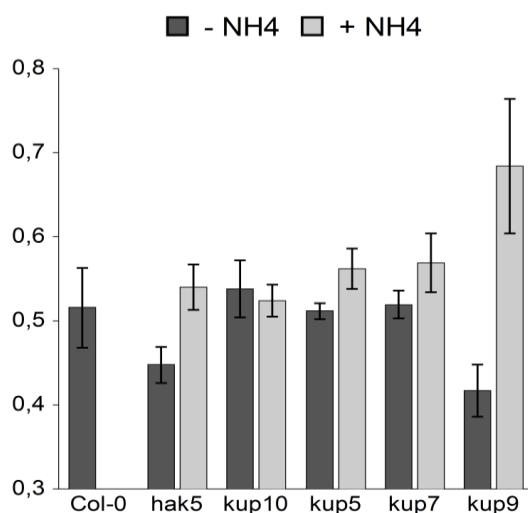
Graf 26: Délka hlavního kořene (+ K⁺)



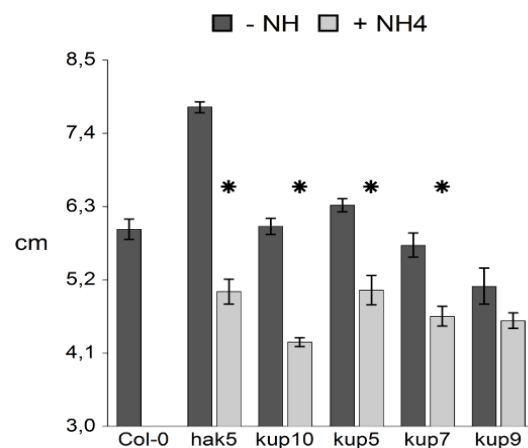
Graf 23: Suchá hmotnost kořenů (- K⁺)



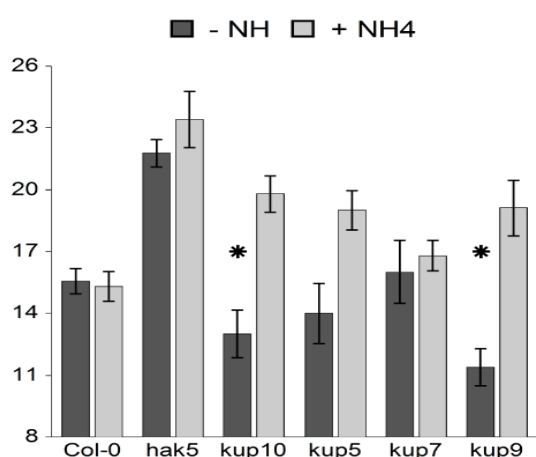
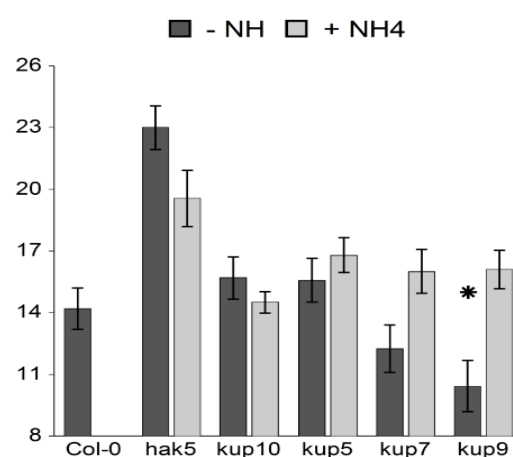
Graf 25: R/S poměr (- K⁺)



Graf 27: Délka hlavního kořene (- K⁺)



Grafy 22 - 27: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, p < 0,05)

Graf 28: Počet postranních kořenů (+ K⁺)**Graf 29:** Počet postranních kořenů (- K⁺)

Grafy 28 a 29: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)

4.2.2 Kultivace 2: vliv K⁺ při absenci NH₄⁺

Tato následující kultivace byla prováděna pouze na médiu bez přítomnosti NH₄⁺ a byly v ní testovány linie pro všechny studované transportéry, konkrétně: *kup5-1*, *kup7-1*, *kup9-1*, *kup10-1* a *hak5-1* (viz tabulku 16). Kontrolním genotypem byla zakoupená Col-0 identická s předchozím experimentem. Pro každou testovanou variantu bylo vysazeno 10 semen. Vzhledem k nehomogenní klíčivosti byl počet hodnocených rostlin pro každou variantu $n = 6 - 10$. Ve výsledcích nejsou uváděna data pro *kup9-1* na vysoké koncentraci K⁺ z důvodu kontaminace kultivace.

Obecné rozdíly v produkci biomasy mezi rostlinami v závislosti na dostupnosti K⁺ jsou obdobné jako u předchozí kultivace. Nedostatek K⁺ snižuje suchou hmotnost prýtlů i kořenů a způsobuje nižší relativní obsah vody v prýtlu (viz grafy 30 - 32, $p < 0,001$).

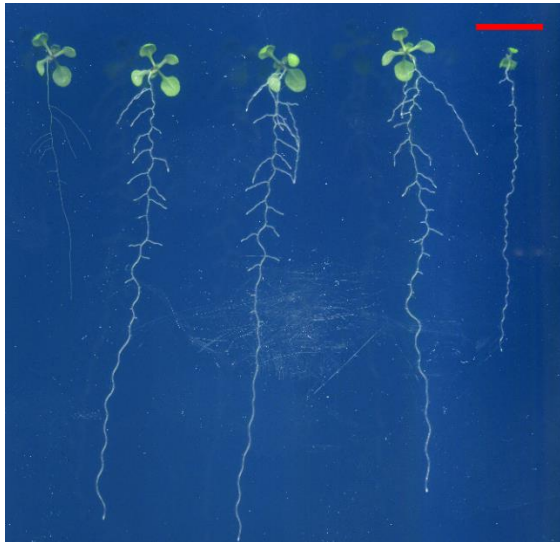
Oproti předchozí kultivaci byl patrný značný vliv dostupnosti K⁺ na architekturu kořenů, rozdíly byly obvykle signifikantní i pro jednotlivé linie. Nízká dostupnost K⁺ snižovala délku hlavního kořene i postranních kořenů ($P < 0,001$), oproti tomu počet postranních kořenů ovlivněn nebyl (viz grafy 33 - 35).

Fenotyp některých T-DNA inzerčních linií

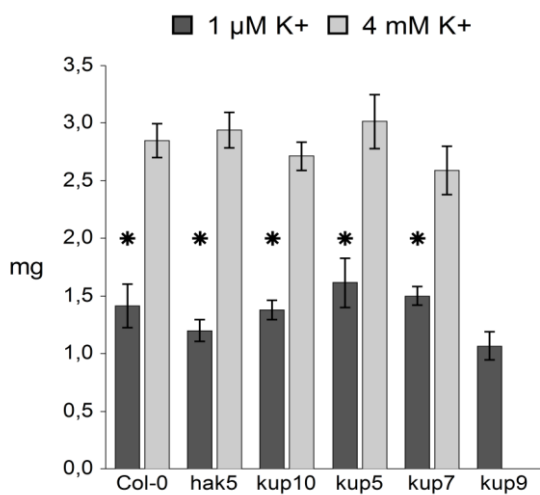
Jedinou linií lišící se svým růstem od Col-0 byla *kup9* (viz obrázek 24). Tato linie měla oproti Col-0 sníženou suchou hmotnost kořenů při nedostatku K⁺ (viz graf 32, $p < 0,05$). To bylo způsobeno sníženým růstem postranních kořenů, které byly signifikantně kratší (viz graf 34, $p < 0,01$), při zachování jejich počtu a délky hlavní osy (viz grafy 33 a 35). V návaznosti na to byl u *kup9* signifikantně snížen poměr délek postranních kořenů a délky hlavního kořene a průměrná délka postranního kořene (viz grafy 36 a 37, $p < 0,01$).

Obrázek 24: Vzhled rostlin po 10 dnech kultivace při $1 \mu\text{M K}^+$.

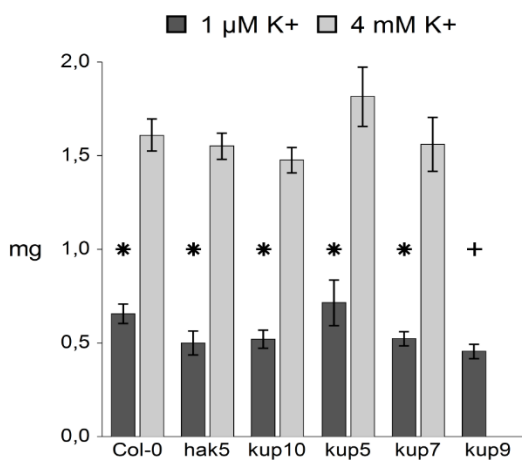
Col-0



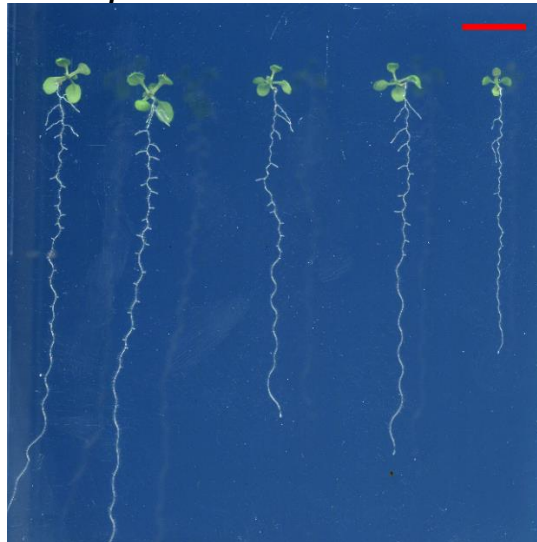
Graf 30: Suchá hmotnost prýtu



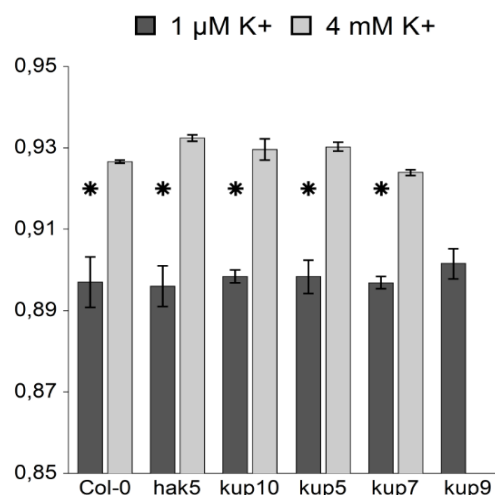
Graf 32: Suchá hmotnost kořenů



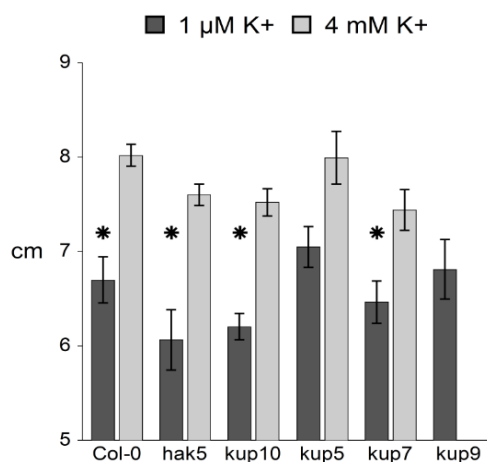
kup9



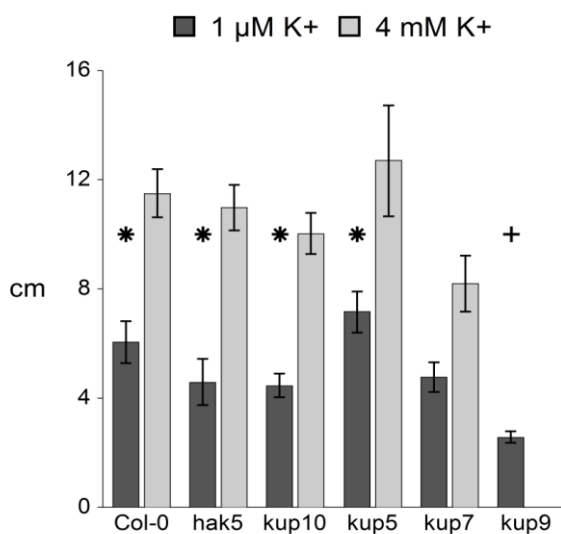
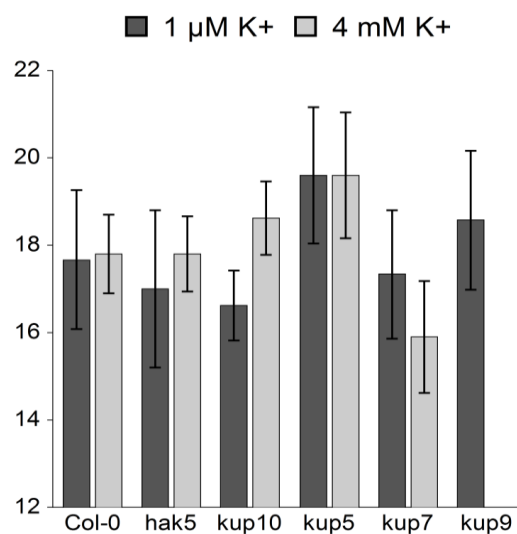
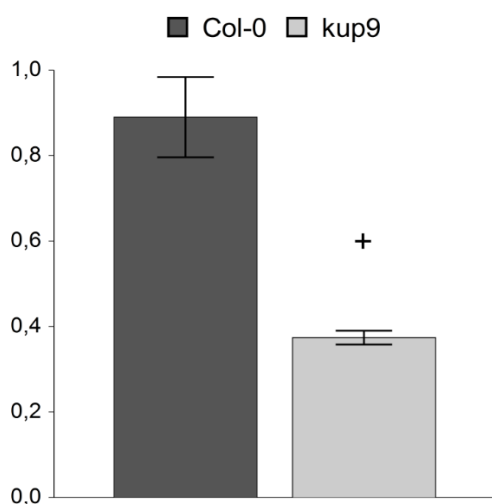
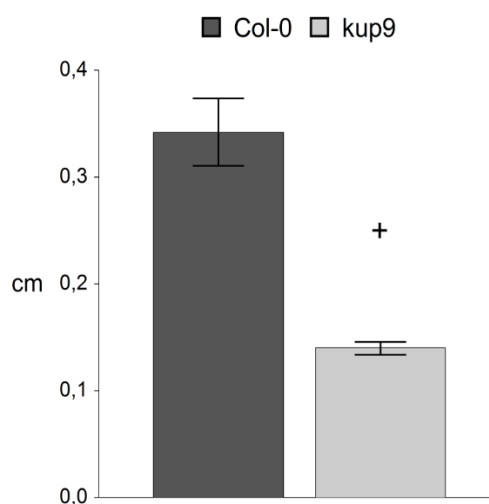
Graf 31: Relativní obsah vody v prýtu



Graf 33: Délka hlavního kořene



Grafy 30 - 33: Průměry \pm SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)
 + značí signifikantní rozdíl oproti Col-0 v dané variantě výživy (T-test, $p < 0,05$). Usečky v obrázcích reprezentují 1 cm

Graf 34: Celková délka postranních kořenů**Graf 35:** Počet postranních kořenů**Graf 36:** Poměr délek postranních kořenů a délky hlavního kořene (- K⁺)**Graf 37:** Průměrná délka postranních kořenů (- K⁺)

Grafy 34 - 37: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)
 + značí signifikantní rozdíl oproti Col-0 v dané variantě výživy (T-test, $p < 0,05$).

4.2.3 Kultivace 3: vliv K⁺ při absenci NH₄⁺ na vybrané linie

V této kultivaci byly rostliny pěstovány pouze na médiu bez přítomnosti NH₄⁺ a byly testovány linie *kup5-1*, *kup9-1* a *hak5-1*. Kontrolním genotypem byla Col-0 vyselektovaná při křížení *kup5-1* a *kup7-1*. Pro každou kombinaci genotypu a varianty výživy bylo vyseto 20 semen, růstové parametry byly hodnoceny pro 12 nejvitálnějších rostlin.

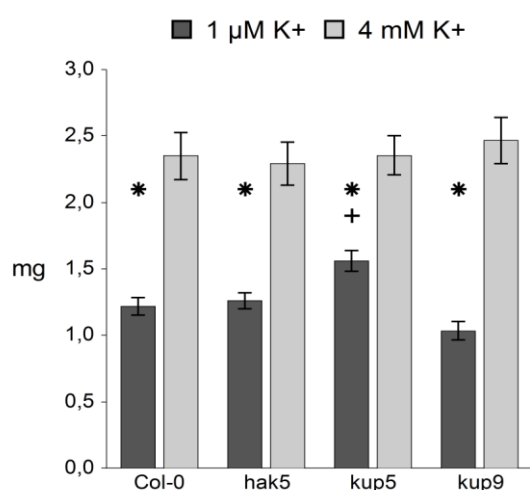
Vliv nízké koncentrace K⁺ se nelišil od předchozí kultivace, napříč liniemi došlo ke snížení suché hmotnosti prýtu i kořene, stejně tak byl negativně ovlivněn relativní obsah vody v prýtu (viz

grafy 38 – 40, $p < 0,001$). Snížení dostupnosti K^+ vedlo ke snížení celkové délky kořenového systému, celkové délky postranních kořenů i délky hlavního kořene (viz grafy 41 - 43, $p < 0,001$).

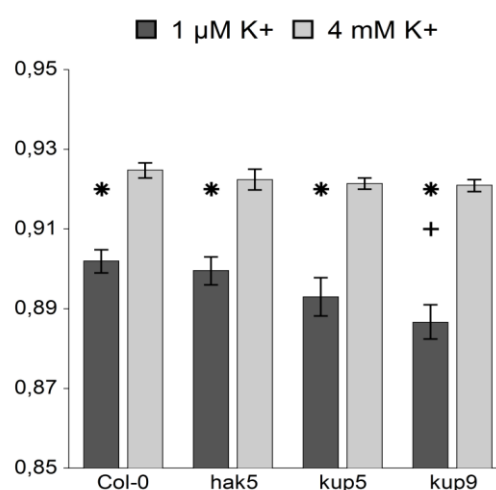
Fenotyp některých T-DNA inzerčních linií

Opět se podařilo potvrdit fenotyp *kup9* oproti Col-0 při nízké koncentraci K^+ . Suchá hmotnost kořenů je sice prakticky stejná u obou linií (viz graf 40), avšak celková délka postranních kořenů je signifikantně nižší u *kup9* (viz graf 43, $p < 0,001$), při zachování délky hlavního kořene (viz graf 42). V návaznosti na zkrácení postranních kořenů se rovněž signifikantně snížila celková délka kořenového systému, poměr délek postranních kořenů a délky hlavního kořene a průměrná délka postranních kořenů (viz grafy 41, 44, 45, $p < 0,001$). Rovněž byl zjištěn snížený relativní obsah vody v prýtu *kup9* (viz graf 39, $p < 0,01$).

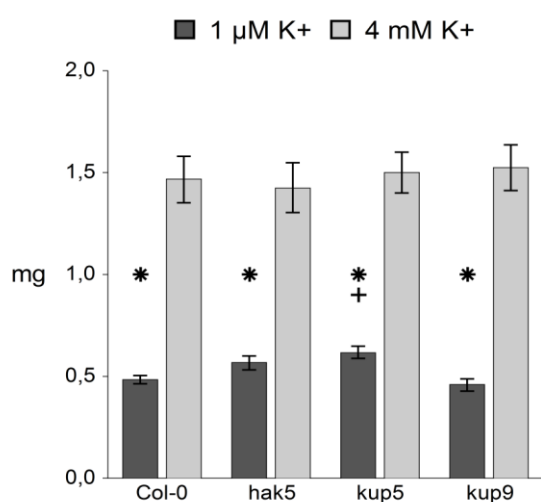
Graf 38: Suchá hmotnost prýtu



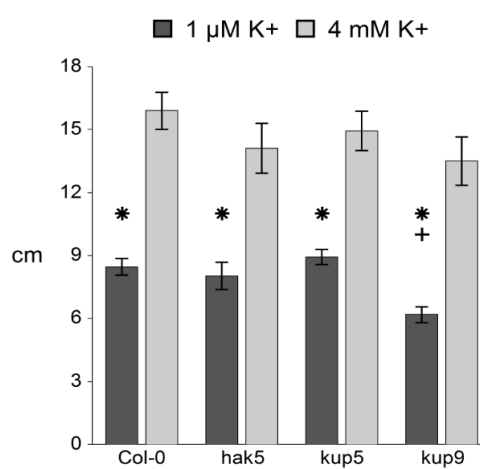
Graf 39: Relativní obsah vody v prýtu



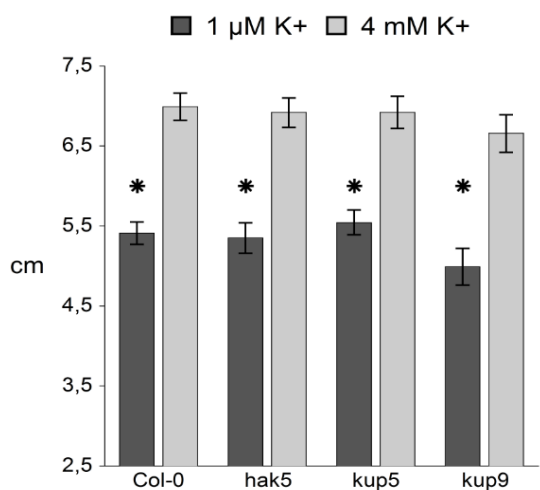
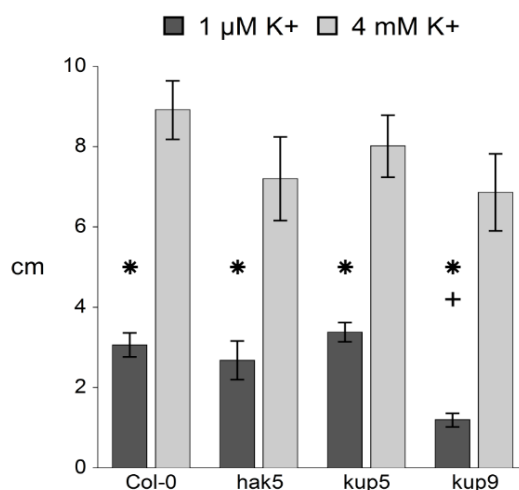
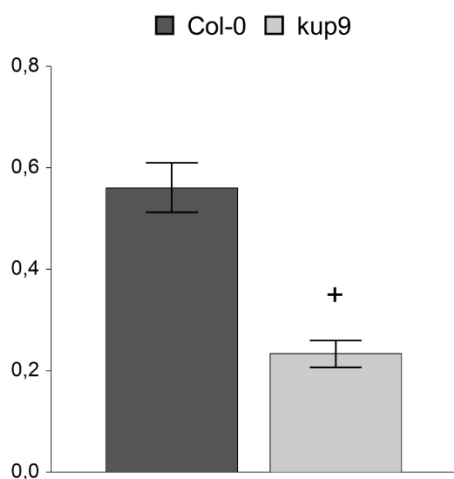
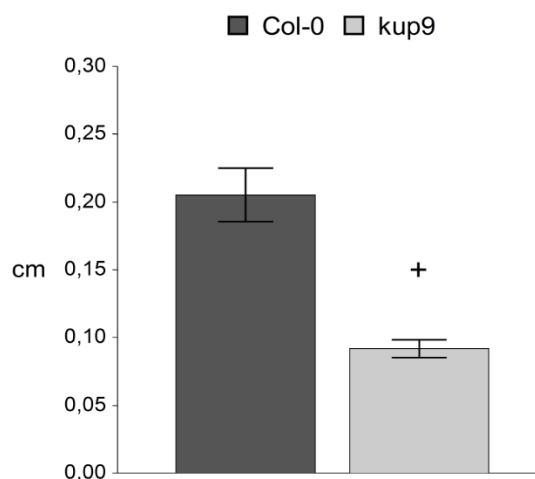
Graf 40: Suchá hmotnost kořenů



Graf 41: Celková délka kořenového systému



Grafy 38 - 41: Průměry \pm SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)
+ značí signifikantní rozdíl oproti Col-0 v dané variantě výživy (T-test, $p < 0,05$)

Graf 42: Délka hlavního kořene**Graf 43: Celková délka postranních kořenů****Graf 44: Poměr délek postranních kořenů a délky hlavního kořene (- K⁺)****Graf 45: Průměrná délka postranních kořenů (- K⁺)**

Grafy 42 - 45: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)
+ značí signifikantní rozdíl oproti Col-0 (T-test, $p < 0,05$)

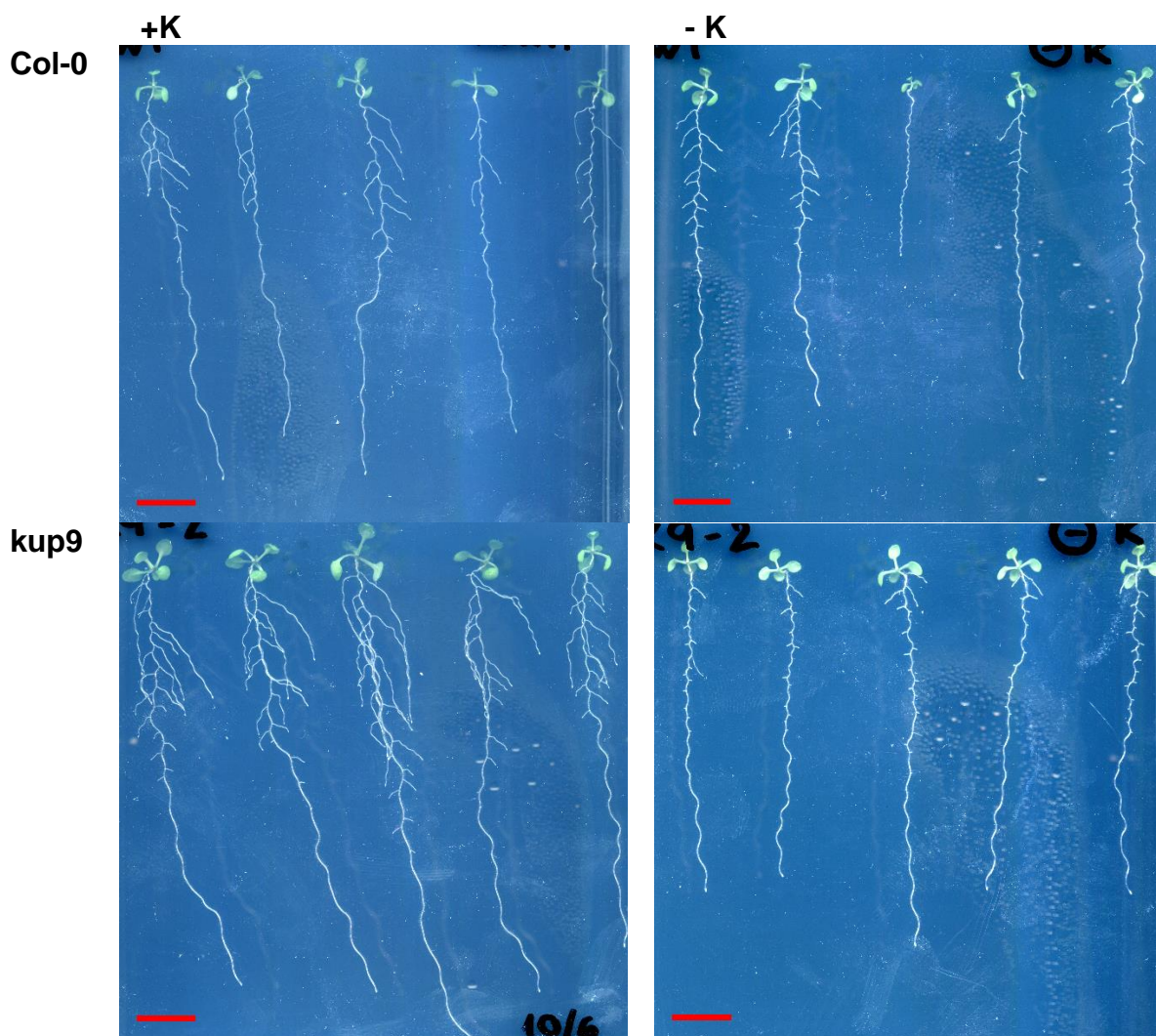
Nově pozorovaným fenotypem byla zvýšená produkce biomasy u *kup5* oproti Col-0. Suchá hmotnost prýtu i kořene byla signifikantně zvýšena (viz grafy 38 a 40, $p < 0,01$), avšak v žádném parametru architektury kořenového systému se linie nelišila od Col-0.

4.2.4 Kultivace4: ověření fenotypu *kup9-1* pomocí *kup9-2*

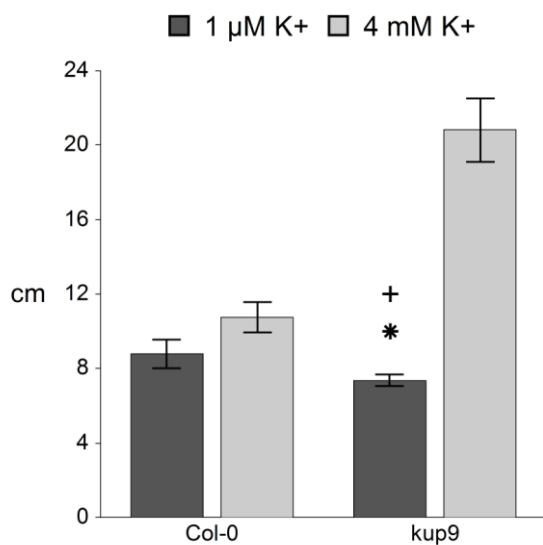
V této kultivaci byly rostliny linie *kup9-2* a Col-0, vyselektované z křížení *kup5-1* a *kup7-1* (viz souhrnnou tabulku 16), pěstovány na médiu bez NH_4^+ . Pro každou kombinaci genotypu a výživy bylo vysazeno 10 semen. Z důvodu nerovnoměrné klíčivosti byl počet rostlin hodnocených pro jednotlivé varianty $n = 5 - 8$. V této kultivaci nebylo prováděno vyhodnocení produkce biomasy rostlinami.

Celkové srovnání těchto dvou linií není možné, protože rostliny Col-0 nejeví výrazné rozdíly mezi variantami K^+ výživy (viz obrázek 25 a grafy 46 - 49). Ovšem ve variantě s $1 \mu\text{M K}^+$ vykazuje *kup9* rozdíly v architektuře kořenového systému oproti Col-0. Stejně jako v předchozí kultivaci má *kup9* kratší postranní kořeny, snížený poměr délky postranních kořenů a hlavního kořene a nižší průměrnou délku postranních kořenů (viz grafy 47 - 49, $p < 0,05$).

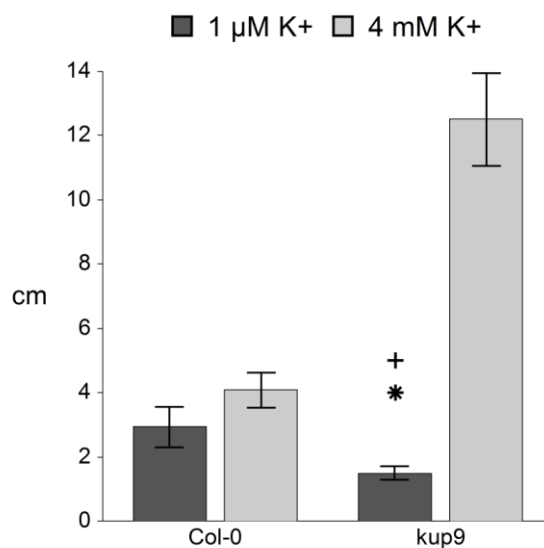
Obrázek 25: Vzhled rostlin po 10 dnech kultivace, úsečky reprezentují 1 cm.



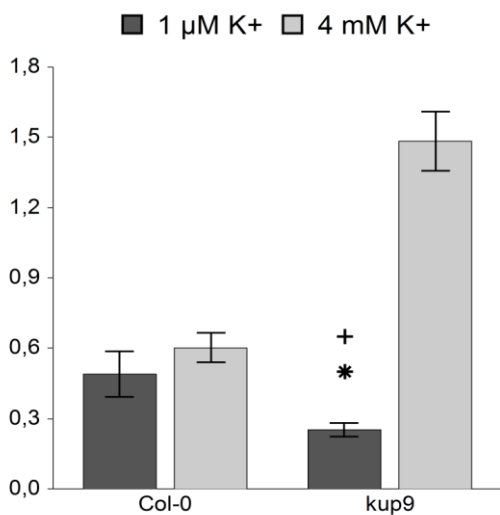
Graf 46: Celková délka kořenového systému



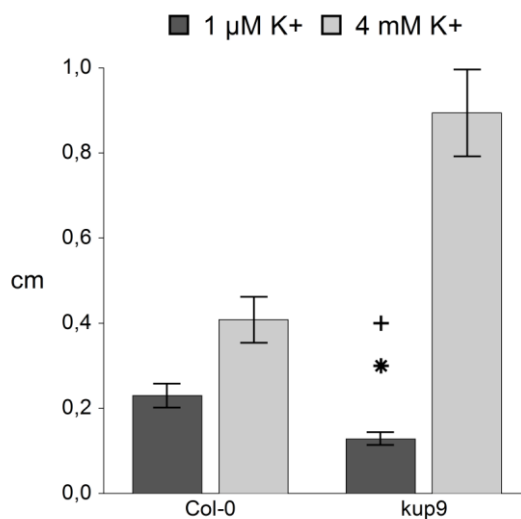
Graf 47: Délka postranních kořenů



Graf 48: Poměr délky postranních kořenů a hlavního kořene



Graf 49: Průměrná délka postranních kořenů



Grafy 46 - 49: Průměry ± SEM, * značí signifikantní rozdíl mezi variantami výživy (ANOVA, $p < 0,05$)
+ značí signifikantní rozdíl oproti Col-0 (T-test, $p < 0,05$)

4.3 Mikroskopická analýza meristémů kořenů *kup9*

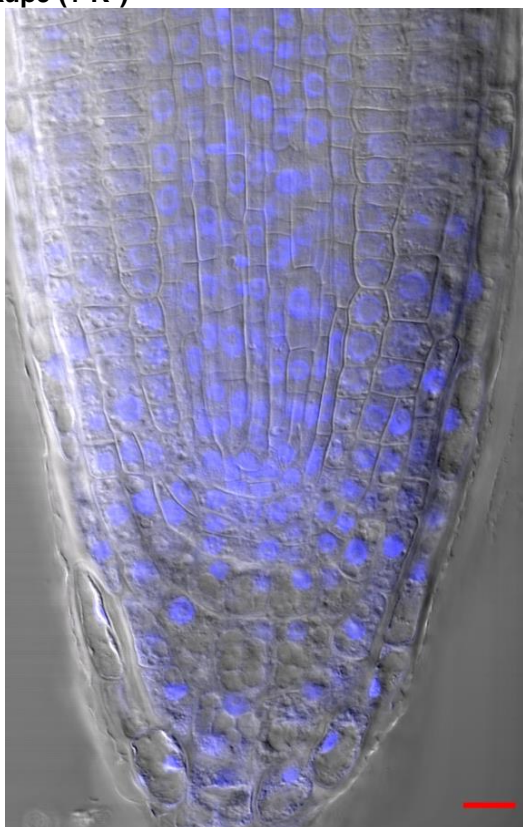
Kořeny desetidenních rostlin byly zafixovány a nejprve pozorovány ve světlém poli s DIC. Bylo zjištěno, že k pozorovatelným změnám v uspořádání kořenových špiček a meristémů dochází pouze u postranních kořenů *kup9* při nízké koncentraci K^+ (viz obrázek 27). Změny byly nejlépe pozorovatelné na nejstarších postranních kořenech (1. – 7. odstupující kořen), oproti tomu u nejmladších postranních kořenů (15. – 20. odstupující) nebyly změny znatelné.

Kořeny byly barveny propidium jodidem (buněčné stěny) a Hoechstovým barvivem (jádra) a nejstarší postranní kořeny byly detailněji pozorovány na konfokálním mikroskopu. Barvení propidium jodidem není ve výsledcích prezentováno, protože byl zachycen pouze signál rozptýlený rovnoměrně po kořeni.

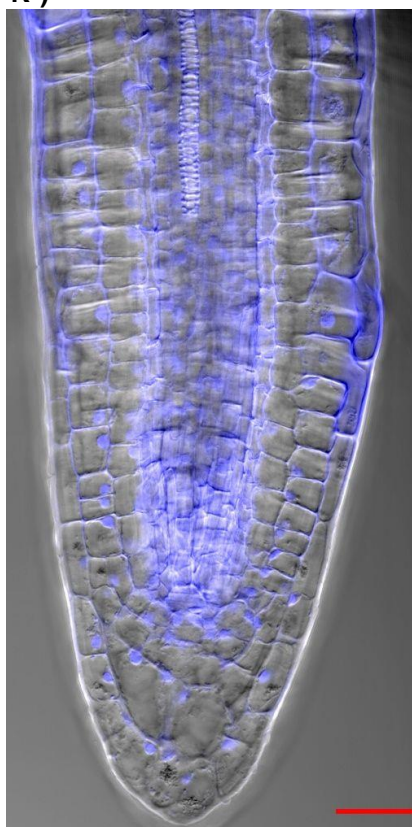
Při prolnutí obrazu DIC a fluorescenčního značení jader je patrné, že špička nejstaršího postranního kořene *kup9* je při nízké koncentraci K^+ tenčí a je tvořena menším počtem buněk. Je patrné, že pletiva kořene *kup9* jsou diferencována blíže apikálnímu meristému, než je tomu u ostatních variant, což dokládá vyvinutá céva xylému a vyvinuté kořenové vlásky v blízkosti apikálního meristému (viz obrázky 26 a 27).

Obrázek 26: Detail anatomie apikálních meristémů nejstarších postranních kořenů *kup9*, modře barvení Hoechstovým barvivem, úsečky reprezentují 20 μm .

kup9 (+ K^+)

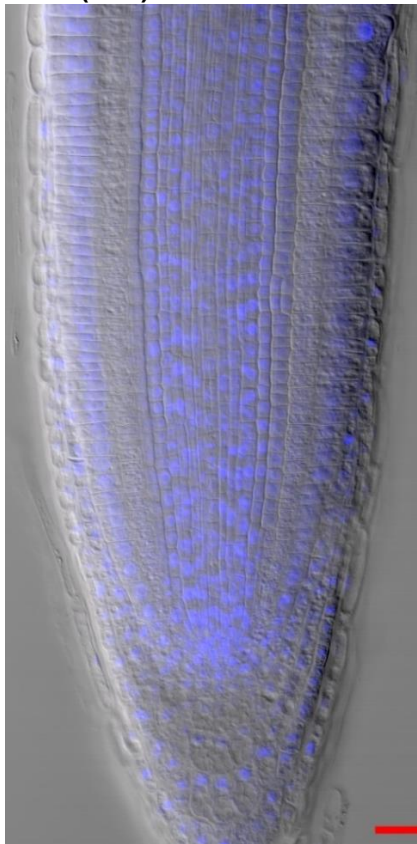


kup9 (- K^+)

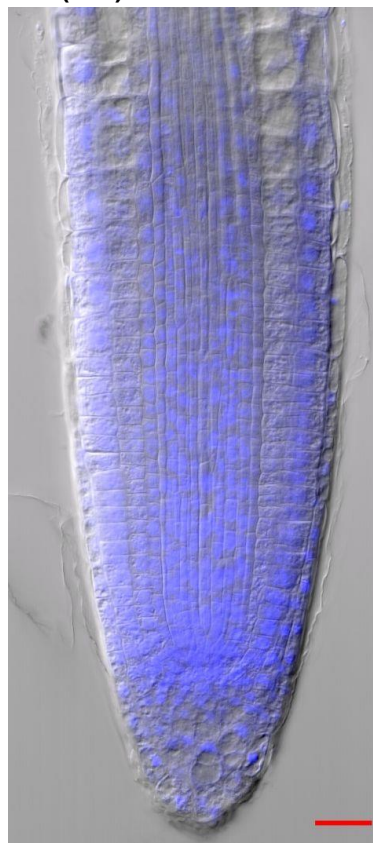


Obrázek 27: Anatomie apikálních meristémů nejstarších postranních kořenů, modře barvení Hoechstovým barvivem, úsečky reprezentují 20 μm .

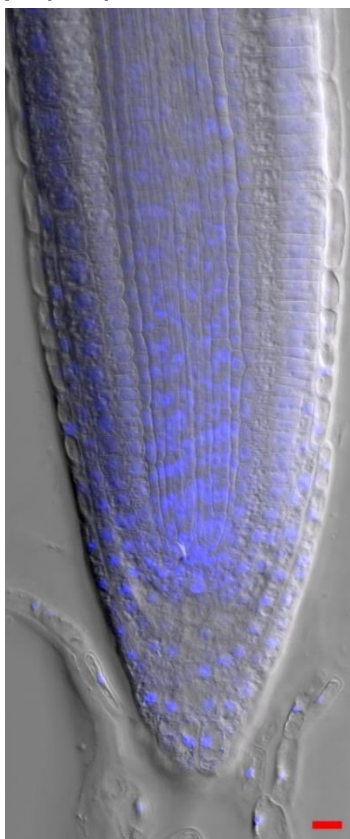
Col-0 (+ K⁺)



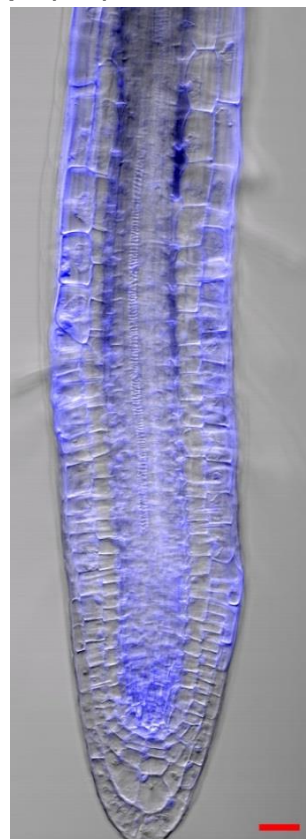
Col (- K⁺)



kup9 (+ K⁺)



kup9 (- K⁺)

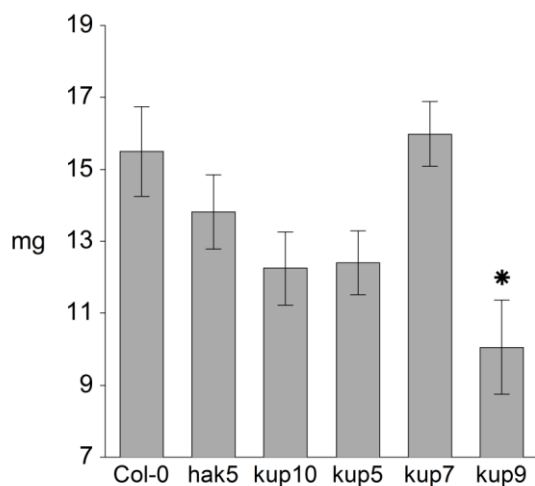


4.4 Odolnost rostlin k suchu

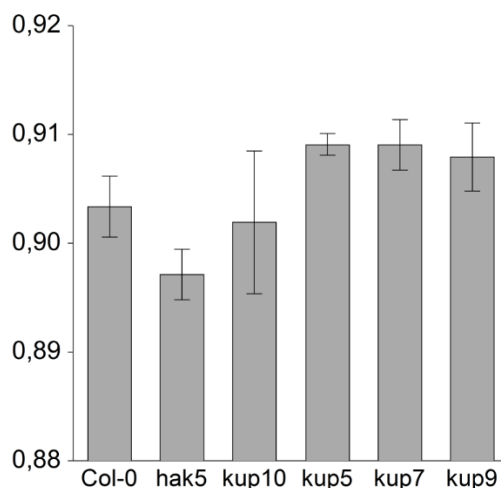
V tomto experimentu byly kultivovány linie pro všechny studované transportéry, konkrétně: *kup5-1*, *kup7-1*, *kup9-1*, *kup10-1* a *hak5-1*. Kontrolním genotypem byla Col-0 vyštěpená při křížení *kup5-1* a *kup7-1*.

Po poslední záливce byly odebrány rostliny z pěti květináčů pro každou variantu $n = 15 - 20$. Tento kontrolní odběr ukázal, že jedinou linií, lišící se v produkci biomasy prýtu od Col-0, je signifikantně menší *kup9* (viz graf 50, $p < 0,05$). Relativní obsah vody v prýtu se nelišil signifikantně u žádné linie (viz graf 51).

Graf 50: Suchá hmotnost prýtu



Graf 51: Relativní obsah vody v prýtu



Grafy 50 a 51: Průměry \pm SEM * značí signifikantní rozdíl od Col-0 (ANOVA, $p < 0,05$)

Po čtyřech dnech bez záливky byly rostliny odebrány ze zbývajících 8 květináčů $n = 32$. Během těchto čtyř dní se rostlinám výrazně vyvinuly květní stvoly, jejich výška byla posléze měřena, neboť byly patrné rozdíly mezi liniemi. Všechny rostliny bez výraznějších rozdílů zčervenaly (viz obrázek 28). Pro suchou hmotnost nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi Col-0 a ostatními liniemi (viz graf 52), oproti tomu všechny linie měly nižší relativní obsah vody než Col-0 (viz graf 53, $p < 0,05$). Především byl rozdíl patrný pro *kup10* a *hak5*. Do čerstvé hmotnosti se nižší obsah vody promítnul jen částečně, signifikantně nižší čerstvou hmotností oproti Col-0 měly pouze linie *kup9*, *kup10* a *hak5* (viz graf 54, $p < 0,05$). Délka květního stvolu nebyla přesným odrazem produkce biomasy ani obsahu vody. *kup9* a *kup10* měly signifikantně kratší stvol než Col-0 (viz graf 55, $p < 0,05$), oproti tomu u *kup5* byly stvoly delší než u Col-0 (viz graf 55, $p < 0,05$).

Obrázek 28: Zčervenání rostlin bez závlivy na příkladu Col-0

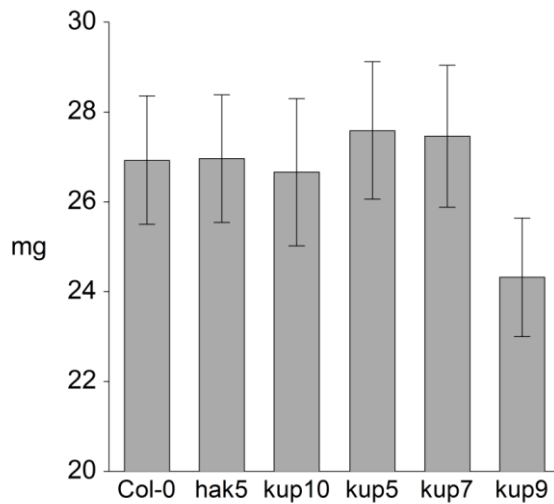
Zalévané



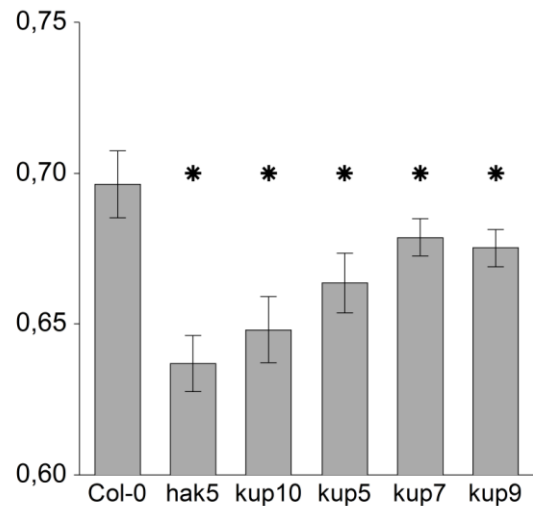
Bez závlivy



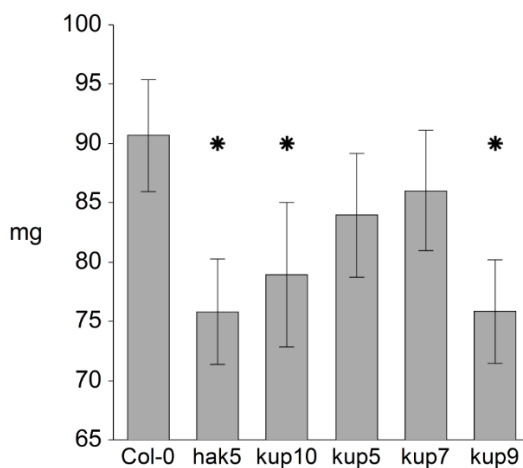
Graf 52: Suchá hmotnost prýtu



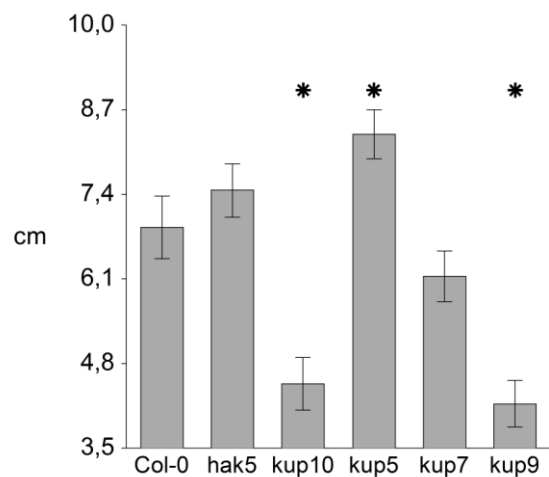
Graf 53: Relativní obsah vody v prýtu



Graf 54: Čerstvá hmotnost prýtu



Graf 55: Délka květního stvolu

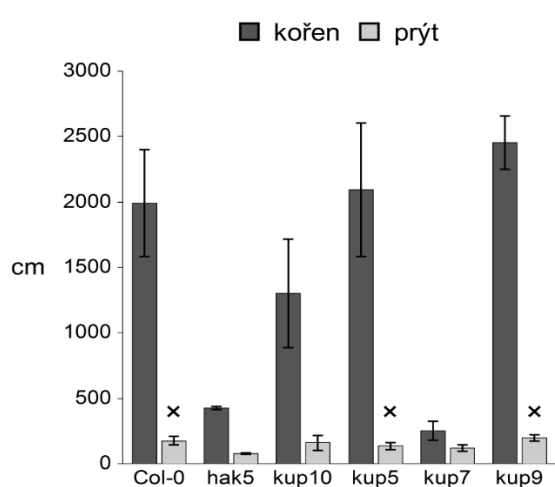


Grafy 52 - 55: Průměry ± SEM * značí signifikantní rozdíl od Col-0 (ANOVA, $p < 0,05$)

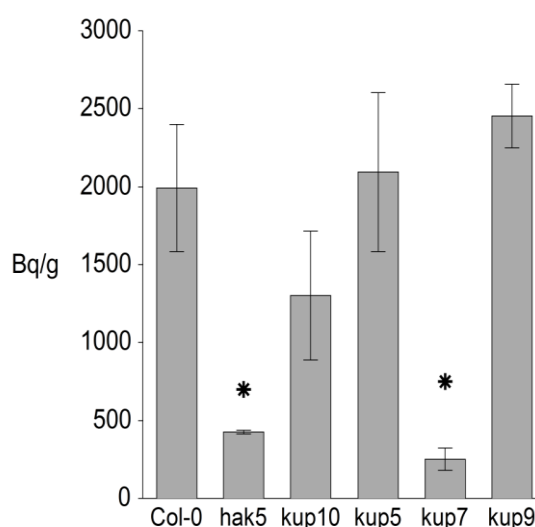
4.5 Akumulace radioizotopu ^{134}Cs

Byla měřena aktivita radioizotopu ^{134}Cs v prýtech a kořenech kultivovaných rostlin. Aktivita v kořenech byla signifikantně vyšší než v prýtech, pro jednotlivé linie byl rozdíl signifikantní u Col-0, *kup5* a *kup9* (viz graf 56, $p < 0,001$). Linie *kup7* a *hak5* vykazovaly nižší aktivitu v kořenech než Col-0 (viz graf 57, $p < 0,05$), aktivita v prýtu byla ovšem signifikantně nižší jen u *hak5* (viz graf 58, $p < 0,05$). Nerovnoměrné snížení akumulace do kořenů a prýtu se projevilo signifikantním snížením poměru aktivit kořeny/prýt (viz graf 59, $p < 0,05$).

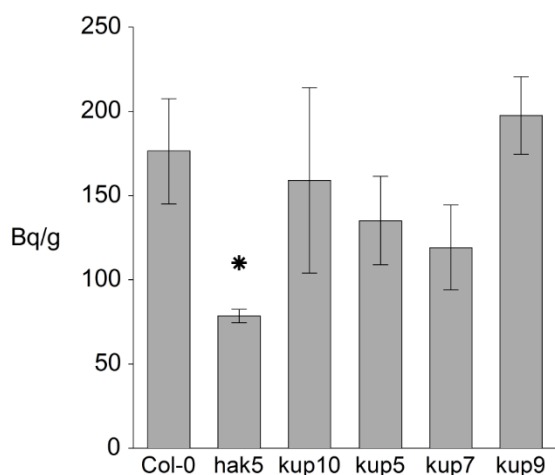
Graf 56: Aktivita v prýtu a kořenech



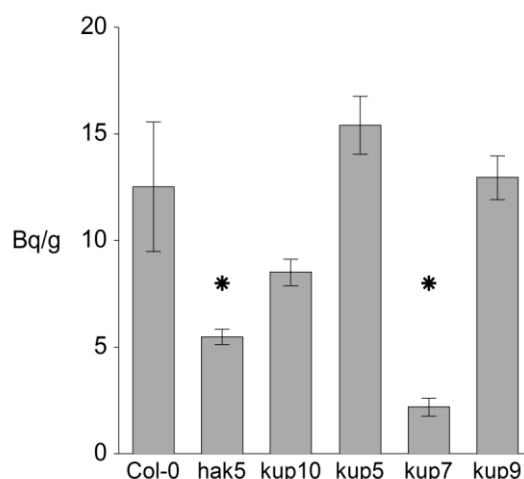
Graf 57: Aktivita v kořenech



Graf 58: Aktivita v prýtu



Graf 59: Poměr aktivit kořeny/prýt



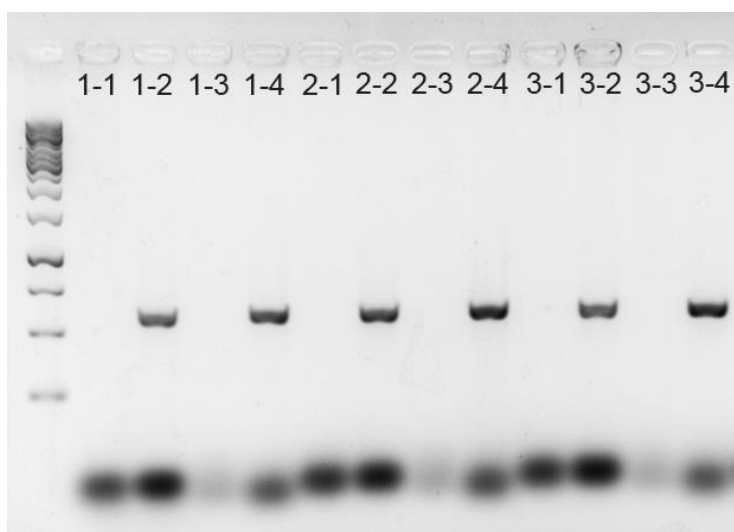
Grafy 56 - 59: Průměry \pm SEM * signifikantní rozdíl rostlinných částí (ANOVA, $p < 0,05$)

* značí signifikantní rozdíl od Col-0 (ANOVA, $p < 0,05$)

4.6 Křížení linií

Za účelem vyselektování dvojnásobných homozygotních mutantů byly kříženy linie pro příbuzné přenašeče, konkrétně: *kup5-1xkup7-1* a *kup9-1xkup10-1*. Přítomnost inzerce v lokusu byla ověřována PCR. Elektroforetické gely s produkty reakcí jsou v obrázcích 29 a 30.

Obrázek 29: První číslo v popisku drah reprezentuje rostlinu, pro druhé číslo 1 – reakce pro WT alelu KUP9, 2 – reakce pro inzerční alelu KUP9, 3 – reakce pro WT alelu KUP10, 4 – reakce pro inzerční alelu KUP10. Všechny testované rostliny jsou tedy homozygotními mutanty.



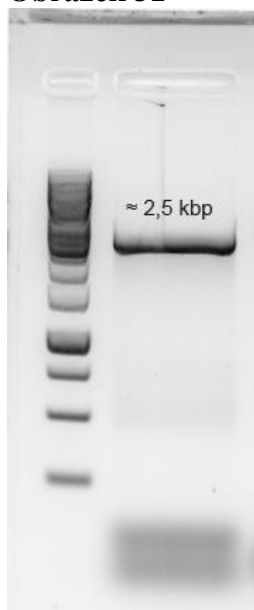
Obrázek 30: První číslo v popisku drah reprezentuje rostlinu, pro druhé číslo 1 – reakce pro WT alelu KUP5, 2 – reakce pro inzerční alelu KUP5, 3 – reakce pro WT alelu KUP7, 4 – reakce pro inzerční alelu KUP7. Všechny testované rostliny jsou tedy homozygotními mutanty.



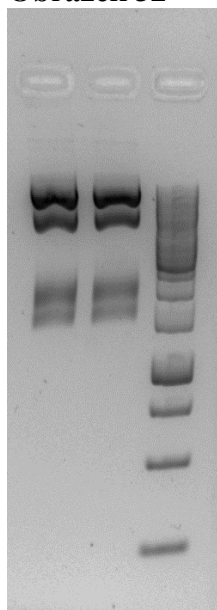
4.7 Transformace *A. thaliana* konstruktem KUP9::GUS

Amplifikace promotorové sekvence KUP9 poskytla 1 produkt odpovídající délky (viz obrázek 31). Tento fragment byl úspěšně zaligován do vektoru pJET1.2 a byl sekvenován. Sekvence odhalila 18 záměn oproti sekvenci Col-0. Všechny tyto záměny byly pomocí veřejně dostupné aplikace SALK *Arabidopsis* 1001 Genomes (<http://signal.salk.edu/atg1001/index.php>) určeny jako záměny běžné v jiných ekotypech *Arabidopsis thaliana*. Promotorový úsek vyštěpený enzymy KpnI a NotI (NEB) byl poté zaligován do vektoru pENTR1A, z něhož byl klonázovou reakcí přenesen do cílového vektoru pMDC162. Po izolaci z *E. coli* byl vektor kontrolně štěpen enzymem NotI (NEB). Reakce produkovala předpokládané 4 produkty různých délek (viz obrázek 32). Baktérie *Agrobacterium tumefaciens* kmene C58C1 byly transformovány konstruktem pKUP9:pMDC162 a 50 ml bakteriální kultury bylo použito pro transformaci poupat 8 rostlin *Arabidopsis thaliana*. Semena transformovaných rostlin byla selektována na rezistenci k hygromycinu (viz obrázek 33).

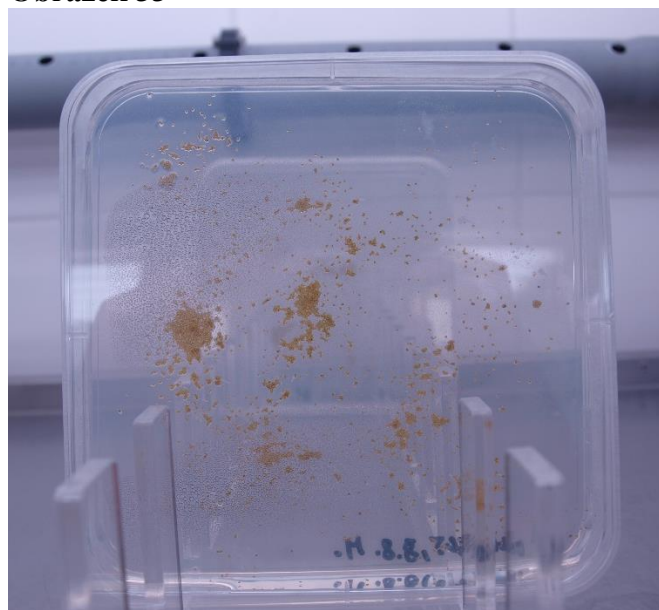
Obrázek 31



Obrázek 32



Obrázek 33



Obrázek 31: Produkt amplifikace, **obrázek 32:** Produkty kontrolního štěpení, **obrázek 33:** selektovaná semena

5 Diskuze

5.1 Růstové parametry T-DNA inzerčních linií

Za účelem charakterizovat linie *kup5-1*, *kup7-1*, *kup9-1*, *kup10-1* byly nejprve provedeny *in vitro* kultivace, při kterých byla sledována produkce biomasy rostlinami a parametry architektury kořenového systému. Kontrolním genotypem byla Col-0 (N60000), která je genetickým pozadím všech testovaných linií. Navíc byly do experimentů zahrnuty linie *hak5-1* a *hak5-2*, tento transportér je důležitým článkem vysokoafinitního příjmu K^+ (Qi et al., 2008, Pyo et al., 2010). Tyto linie měly tedy vykazovat růstový fenotyp při nedostupnosti K^+ a pomoci tak odlišit případné fenotypy zkoumaných linií. Vzhledem k tomu, že *hak5-1* a *hak5-2* mutanty jsou od Col-0 odlišitelní až na koncentracích K^+ nižších než $10 \mu\text{M}$ (Pyo et al., 2010) byly K^+ stresové podmínky určeny na $1 \mu\text{M } K^+$. Vzhledem k tomu, že exprese AtHAK5 je inhibována externími koncentracemi NH_4^+ (Qi et al., 2008), byly rovněž provedeny kultivace zkoumající vliv tohoto iontu na růst linií.

5.1.1 Kultivační média

Rostliny byly kultivovány na médiích odvozených od 0,2x MS média (Murashige a Skoog, 1962), lišících se obsahem K^+ a NH_4^+ . NH_4NO_3 ($\approx 4\text{mM}$), KNO_3 a KH_2PO_4 ($\approx 4 \text{mM}$) tvoří dohromady skoro 90 % látkového množství všech solí obsažených v 0,2x MS médiu, proto úpravy těchto komponent výrazně mění složení média. Ve variantě bez obsahu NH_4^+ byl z média odebrán NH_4NO_3 , výsledné médium tedy mělo třikrát nižší obsah dusíku než 0,2x MS, ale $3,76 \text{mM } \text{NO}_3^-$ není koncentrace dostatečně nízká pro inhibici růstu (Remans et al., 2006). Toto médium rovněž mělo téměř poloviční osmolaritu než 0,2x MS. Ve variantě obsahující NH_4^+ byly do média přidány $4 \text{mM } \text{NH}_4\text{Cl}$, tato varianta tedy byla přibližně dvakrát bohatší na dusík a měla téměř dvakrát vyšší osmolaritu.

Pro variantu s $1 \mu\text{M } K^+$ byly KNO_3 a KH_2PO_4 nahrazeny soli sodnými. Není znám žádný účinek Na^+ na rostliny v koncentraci 4mM , pro navození stresu zasolením se používají koncentrace 50mM a vyšší (Munns a Tester, 2008).

5.1.2 Vliv dostupnosti K⁺

Dramatické snížení dostupnosti K⁺ vedlo k očekávanému snížení růstových parametrů stresovaných rostlin. Suchá hmotnost prýtu byla nižší napříč téměř všemi liniemi, nesignifikantní rozdíly v kultivaci 1 ve variantě + NH₄⁺ je možno přisoudit, z neznámého důvodu, sníženému růstu kontrolních rostlin. V kultivaci 2 a 3 jsou za stejných podmínek rozdíly velmi výrazné. Snížená byla rovněž suchá hmotnost kořenů, ve variantě + NH₄⁺ byl tento efekt zřejmě částečně překryt sníženým růstem kořenů v důsledku vyšší dostupnosti dusíku (Linkohr et al., 2002). R/S poměr byl výrazně ovlivněn NH₄⁺ a bude diskutován dále.

Menší dostupnost K⁺ také snižovala relativní obsah vody v prýtu stresovaných rostlin, což je zřetelné ve variantě - NH₄⁺ u kultivace 1, 2 i 3. Zvýšená osmolarita + NH₄⁺ média neměla na stresované rostliny vliv. Vliv nedostatku K⁺ byl studován například u řepy (*Beta vulgaris*), u které sice snižoval transpiraci, ale rovněž výrazně snižoval příjem vody kořeny (Graham a Ulrich, 1972). Pro rostliny bavlníku (*Gossypium hirsutum*) byla zaznamenána zhoršená efektivita využití vody (water use efficiency) při nedostatku K⁺ (Pervez et al., 2004). V podmínkách *in vitro* se stálou vlhkostí efekt zhoršeného příjmu vody kořeny pravděpodobně nejvíce ovlivňuje relativní obsah vody v rostlinách.

Dostupnost K⁺ měla signifikantní vliv na architekturu kořenového systému, pouze pokud bereme v úvahu všechny rostliny v kultivaci 1. V kultivaci 2 a 3 již můžeme pozorovat jasný fenotyp. Snížená dostupnost K⁺ způsobovala zkrácení hlavního kořene i kořenů postranních při zachování počtu vyvinutých postranních kořenů. Tato data odpovídají pozorované odpovědi Col-0, genetického pozadí všech linií, na sníženou dostupnost K⁺. Col-0 omezuje růst postranních kořenů při relativním zachování růstu hlavního kořene, počet postranních kořenů se nemění, oproti tomu jiné ekotypy zastavují růst hlavního kořene, který je přerůstán postranními kořeny (Kellermeier et al., 2013).

Některé linie vykazovaly signifikantně odlišné parametry oproti Col-0, jednou z nich je *kup5*. Až kultivace 3 potvrdila v signifikantních rozdílech podezření, že *kup5* produkuje více biomasy při nedostatku K⁺. Ačkoli je zřejmé, že tento fenotyp bude třeba potvrdit v dalších kultivacích, nejedná se pravděpodobně, vzhledem k vyššímu počtu opakování v kultivaci 3 o mylně pozitivní výsledek. Vyšší suchá hmotnost prýtu i kořenů oproti Col-0 poukazuje na pravděpodobnou funkci KUP5 v exportu K⁺ z buněk (Osakabe et al., 2013).

Další linií s odlišnými vlastnostmi oproti Col-0 při nedostatku K⁺ byla *kup10*. Rozdíly v architektuře kořenového systému byly pozorovány při aplikaci 4 mM NH₄⁺ a *kup10* byla jediná linie,

kteřá za těchto podmínek vykazovala růstový fenotyp. Tato linie měla kratší hlavní kořen i postranní kořeny. Ovšem v žádné další kultivaci bez přídavku NH_4^+ se tento fenotyp neprojevil. Vzhledem k tomuto faktu a tomu, že nebylo k dispozici srovnání s Col-0 nebyla tato linie dále zkoumána.

Oproti očekávání nebyl u rostlin *hak5* pozorován snížený růst při $1 \mu\text{M K}^+$ (viz níže). Naopak v kultivaci 1 byla linie *hak5-1* výrazně větší než ostatní linie. Vzhledem k tomu, že v kultivaci 2 se stejná linie nelišila od Col-0 při obou nutričních scénářích je nadprůměrný růst pravděpodobně jen dílem náhody.

5.1.3 Vliv přídavku NH_4^+

Přídavek 4 mM NH_4^+ neměl vliv na suchou hmotnost prýtů $+K^+$ rostlin, což potvrzuje, že rostliny v $- \text{NH}_4^+$ kultivaci nebyly omezeny nedostatkem dusíku. Zato přídavek 4 mM NH_4^+ snižoval suchou hmotnost kořenů $+K^+$ rostlin, což je známá odpověď *A. thaliana* na zvýšenou dostupnost dusíku (Linkohr et al., 2002). Přítomnost 4 mM NH_4^+ neměla žádný vliv na K^+ stresované rostliny. Absence tohoto vlivu je velmi překvapivá, protože bylo opakovaně prokázáno že NH_4^+ v řádu jednotek mM blokuje vysokoafinitní příjem K^+ a rostliny nejsou schopny přijímat K^+ už při externí koncentraci $25 \mu\text{M}$ (Rubio et al., 2008). Navíc semenáčky *A. thaliana* potřebovaly za přítomnosti 4 mM NH_4^+ $30 \mu\text{M K}^+$ pro potlačení inhibice růstu kořenů přítomností NH_4^+ (Cao et al., 1993). Reálná koncentrace K^+ ve stresovém médiu použitým v této diplomové práci ovšem zůstává otázkou, neboť bylo zjištěno, že agar obsahuje K^+ v řádu mikromolů (Qi et al., 2008, Pyo et al., 2010), ovšem obsah K^+ v použitém agaru (Sigma) znám není. Je tedy pravděpodobné, že reálný obsah K^+ ve stresovém médiu je několikanásobně vyšší. Vzhledem k tomu, že při kultivacích nebyl pozorován žádný růstový defekt u mutantů *hak5*, přestože dle již publikovaných výsledků by jej identické linie měly při $1\text{-}10 \mu\text{M K}^+$ vykazovat (Qi et al., 2008, Pyo et al., 2010), můžeme se domnívat, že tato koncentrace je vyšší než $10 \mu\text{M}$.

Zvýšená osmolarita $+ \text{NH}_4^+$ média neměla vliv na relativní obsah vody v prýtu stresovaných rostlin. Oproti tomu $+K^+ + \text{NH}_4^+$ rostliny měly nižší relativní obsah vody než jejich $- \text{NH}_4^+$ protějšky, což je možné vysvětlit tím, že $+K^+$ rostliny více využívají růst zvyšováním turgoru a tuto „vodu navíc“ již nedokáží přijmout z média s vyšší osmolaritou. Výrazný vliv vyšší osmolarity média nebyl očekáván, protože obvyklé koncentrace solutů navozující osmotický stres jsou $50\text{--}100 \text{ mM}$ (Munns a Tester, 2008).

R/S poměr byl ovlivňován přítomností NH_4^+ . U K^+ stresovaných rostlin byl R/S poměr téměř konstantní, pravděpodobně z důvodu zásadního omezení růstu vlivem nedostatku K^+ . Oproti tomu

u rostlin s dostatkem K^+ se projevilo snížení růstu kořenů při dostatku dusíku (Linkohr et al., 2002) až do takové míry, že došlo k převrácení vztahu R/S poměru ke K^+ výživě.

Přídavek NH_4^+ způsoboval zkrácení hlavního kořene a zakládání většího počtu postranních kořenů, což odpovídá reakci Col-0 na přídavek NH_4^+ (Lima et al., 2010).

5.1.4 Fenotyp *kup9*

Růstový defekt *kup9*

Nejvýraznější fenotyp pozorovaný v kultivacích měla linie *kup9-1*. V kultivacích 1 a 2 měla linie *kup9-1* při nedostatku K^+ sníženou suchou hmotnost kořenů, což bylo způsobeno velmi omezeným růstem postranních kořenů. Celková délka kořenového systému i celková délka postranních kořenů byla signifikantně nižší, oproti tomu délka hlavního kořene a počet postranních kořenů nevykazovaly změnu v porovnání s kontrolními rostlinami. I další charakteristiky kořenového systému operující s délkou postranních kořenů byly sniženy, velmi často signifikantně, je tedy zřejmé, že rostliny *kup9-1* se liší od Col-0 při nedostatku K^+ především průměrnou délkou postranních kořenů. Stejný fenotypový projev byl pozorován u linie *kup9-2*, je tedy možno předpokládat, že je spojen s vyřazením funkce KUP9.

V kultivaci 3 se tyto výsledky podařilo reprodukovat s výjimkou snížení suché hmotnosti kořenů. Tento nezdar je možno interpretovat nedostatečnou průkazností prvních dvou kultivací: v kultivaci 3 se podařilo dosáhnout $n = 12$ pro všechny varianty genotypu a výživy a můžeme říct, že tyto výsledky jsou důvěryhodnější.

Defekt růstu postranních kořenů byl pozorován pouze u K^+ stresovaných rostlin, navíc je možné pozorovat lepší růst nejstarších postranních kořenů, u kterých můžeme předpokládat částečné zásobení K^+ za semene, proto se můžeme domnívat, že defekt souvisí s transportem K^+ zprostředkovaným KUP9 a tedy se zásobeností postranních kořenů K^+ . Fenotyp nebyl pozorován při 4 mM NH_4^+ a pravděpodobně tedy nějak souvisí s celkovým nutričním stavem rostliny, rovněž je možné že se fenotyp projevuje i při nedostatku jiných živin, avšak tuto možnost bude třeba ještě prověřit.

Mikroskopická analýza meristémů kořenů *kup9*

Kratší postranní kořeny a kořeny viditelně tenčí kořenová špička, tvořená menším počtem buněk u rostlin *kup9-1* časnější terminaci aktivity apikálního meristému kořene. To potvrzuje i diferenciaci pletiv kořene blíže kořenové špičce, jak je zřejmé díky pozorovatelným kořenovým

vláskům a cévám xylému. S tím je pravděpodobně spojena i silná autofluorescence ve špičkách *kup9-1*, která je pravděpodobně způsobena lignifikací buněčných stěn.

Změny v uspořádání meristémů byly v souladu s růstovými parametry pozorovány pouze u *kup9-1* při nedostatku K^+ . U desetidenních rostlin nebyly patrné změny na nejmladších postranních kořenech. Tyto změny jsou tedy patrně indukované po jisté době vývoje kořene a souvisí s jeho nízkou zásobeností K^+ . Nejstarší postranní kořeny jsou sice nejdelší pravděpodobně díky zásobám ze semene, ale změny jsou na nich jasně znatelné, jejich počáteční výhoda je tedy vyvážena delší dobou kdy se potýkají s K^+ chudým médiem.

Data v této kapitole jsou založena pouze na pozorování DIC snímků a barvení jader, která nemohou být kvantifikována. Pro detailnější studii bude muset být použit pozměněný protokol pro barvení buněčných stěn propidium jodidem.

Srovnání *kup9* s dalšími odpověďmi na deficienci

Na nedostatek P rostliny *A. thaliana* reagují vytvářením mělčího, ale širšího kořenového systému tím, že dochází k výraznému zkrácení hlavního kořene a vývinu mnoha kořenů postranních (López-Bucio et al., 2002, López-Bucio et al., 2003). K vývinu mnoha postranních kořenů dochází v důsledku větší citlivosti buněk pericyklu a primordií postranních kořenů k auxinu (López-Bucio et al., 2002). U hlavního kořene docházelo k terminaci apikálního meristému. Meristém postupně ztrácel mitotickou aktivitu, až došlo k diferenciaci buněk přímo navazujících na meristemickou zónu. Tyto změny byly spojeny s dělením buněk klidového centra. Při barvení propidium jodidem nebyly nalezeny žádné mrtvé buňky v meristému (Sánchez-Calderón et al., 2005). Zastavení vývoje hlavního kořene není závislé na auxinu, neboť mutanty v auxinovém transportu ovlivňovaly pouze iniciaci postranních kořenů (López-Bucio et al., 2005).

Deficience N způsobuje jinou systémovou odpověď, kterou je prodlužování postranních kořenů. Pokud se ovšem kořeny nachází v proměnlivé koncentraci N, prodlužují se pouze postranní kořeny nacházející se v prostředí s vyšší koncentrací N (Linkohr et al., 2002).

Při porovnání odpovědi na deficienci P a K^+ nebyla u 12 denních rostlin Col-0 deficientních pro K^+ pozorována žádná terminace meristému hlavního kořene ve smyslu diferenciovanych buněk blíže meristému, pouze zkrácení hlavního kořene (Sánchez-Calderón et al., 2005). Pro různé ekotypy *A. thaliana* byly pozorovány dvě odlišné strategie přizpůsobení deficienci K^+ : První z nich bylo zastavení růstu hlavního kořene při zvýšení růstu postranních kořenů, které ani tak nedosahovaly přírůstků, jaké jsou při dostatku K^+ . Druhou strategií bylo zastavení růstu postranních kořenů, při relativním zachování růstu hlavního kořene, do této kategorie spadá Col-0. U obou strategií nebylo možno dodáním K^+ obnovit růst zastavených kořenů po 6 dnech od vyklíčení.

Barvení propidium jodidem odhalilo léze mrtvých buněk v meristematické zóně postranních kořenů Col-0 (Kellermeier et al., 2013).

Col-0 tedy zastavuje růst postranních kořenů, což se u *kup9* mutantů děje v ještě dřívější fázi vývoje, protože mají signifikantně kratší postranní kořeny. Diferenciace buněk u zkoumaných 10 denních rostlin probíhá blíže meristematické zóně, než je tomu u kontrolních rostlin, avšak doposud nepostoupila až do její těsné blízkosti. To může být způsobeno tím, že meristémy jsou ještě omezeně aktivní, což je vzhledem k pozorované autofluorescenci nepravděpodobné, nebo jsou meristémy terminované a diferenciace postoupí až k nim již velice brzy. Vzhledem k tomu, že na nejmladších postranních kořenech není znát žádné změny je zdá se reakce závislá na době působení deficiencie K^+ na daný postranní kořen. To spolu s pozorováním, že + K^+ *kup9* rostliny nejeví žádný fenotyp, vede k hypotéze, že snížený růst postranních kořenů *kup9* je způsoben jejich nedostatečným zásobením K^+ a že KUP9 hraje roli v transportu K^+ do těchto kořenů. Ovšem není možné doposud vyloučit hypotézu, že jde o změnu v signalizaci, například že KUP9 diriguje transport auxinu jako je tomu u TRH1 (Rigas et al., 2013).

5.2 Odolnost rostlin k suchu

K^+ je nejdůležitějším osmotikem rostlinné buňky a jeho homeostáze, je klíčová pro správný růst buněk především při nedostatku vody. Bylo prokázáno zapojení KT/HAK/KUP transportérů do regulace objemového růstu buněk *A. thaliana* a jejich funkce v pohybech průduchů (Osakabe et al., 2013). Za účelem ověřit zapojení některého z přenašečů do odpovědi na stres suchem byl uskutečněn tento experiment, který rovněž umožňuje prověřit růstové parametry mutantních linií v přirozených podmínkách.

V kontrolním odběru rostlin nevystavených suchu nebyl signifikantní rozdíl v relativním obsahu vody v prýtu. To odpovídá pozorování rostlin například při propagaci, kdy žádná linie netrpěla růstovými defekty za normálních kultivačních podmínek. Pro suchou hmotnost prýtu bylo zaznamenáno signifikantní snížení u *kup9*, což evokuje otázku, zda je možné, že se vyřazení jednoho K^+ transportéru projeví v růstových vlastnostech až v podmínkách kultivační místnosti, kde rostlina musí čelit více stresorům než je tomu *in vitro*. Rovněž je třeba brát v úvahu, že v této kultivaci bylo dosaženo největšího počtu opakování a je možno prokázat i drobnější rozdíly.

V odběru rostlin vystavených 4 dennímu suchu byla pouze suchá hmotnost *kup9* nižší než u Col-0, ale nikoli signifikantně. Oproti tomu všechny mutantní linie měly signifikantně nižší relativní obsah vody v prýtu než kontrolní genotyp. Nižší relativní obsah vody v prýtech se jen částečně promítnul do čerstvých hmotností, když signifikantně nižší byly jen u *hak5-1*, *kup9-1* a

kup10-1. Rostlinám byly rovněž měřeny délky květních stvolů. Ty byly signifikantně kratší pro *kup9* a *kup10* než tomu bylo u Col-0, naopak *kup5* měl květní stvol signifikantně delší.

Obsah K^+ v substrátu nebyl stanoven, ale je možno ho odhadnout. Každý květináč obsahoval přibližně 60 g kompostové zeminy, která může obsahovat přibližně 0,3 % dostupného K^+ (Kumar et al., 2009), což znamená 180 mg dostupného K^+ na květináč. Takovéto množství přidané do květináče naplněného vodou by dalo vzniknout 36 mM roztoku, tedy více než dostatečné koncentraci. Vodovodní voda obsahuje obvykle mezi 1 a 6 mg/l K^+ s průměrnou hodnotou 2,5 mg/l (WHO, 1999). Vodou s průměrným obsahem bylo tedy během kultivace dodáno závlivkou méně než 1 mg K^+ do každého květináče.

Zdá se tedy, že u všech zkoumaných transportérů vede jejich vyřazení ke zhoršení vodního hospodářství rostlin za stresových podmínek. Takový fenotyp pochopitelně není možno odhalit v kultivacích *in vitro*, kde jsou rostliny v téměř stálé vlhkosti. Jako vysvětlení se nabízí funkce K^+ jako hlavního osmotika rostlinné buňky, avšak ne všechny přenašeče musí být zapojeny v K^+ homeostáze buněk prýtu.

Pro transportér KUP9 byla v této práci dokumentována funkce v růstu postranních kořenů, ovšem rostliny v této kultivaci měly pravděpodobně dostatek K^+ a tudíž i plně vyvinutý kořenový systém. Rostliny *kup9* měly snížený obsah vody, potažmo čerstvé hmotnosti a nesignifikantně sníženou suchou hmotnost oproti Col-0. Kratším květní stvol může znamenat pozdější vstup do generativní fáze vlivem zhoršeného růstu, není ovšem jasné jakým mechanismem vyřazení KUP9 vede k celkovému růstovému deficitu.

Mutant *kup5* vykazoval v *in vitro* kulturách zvýšenou suchou hmotnost, což může znamenat funkci ve výdeji K^+ z buňky. Tímto by mohlo být ovlivněno zavírání průduchů, avšak tato funkce by byla pravděpodobně redundantní s dalšími přenašeči K^+ (Szyroki et al., 2001, Osakabe et al., 2013). I přes snížený relativní obsah vody nevykazoval *kup5* signifikantně sníženou čerstvou hmotnost. Květní stvol byl dokonce signifikantně delší než u Col-0, což je pravděpodobně pouze dílem náhodné variability.

Obzvlášť složité je vysvětlit snížení obsahu vody u *hak5*. Tento transportér by za těchto podmínek vůbec neměl být v kořeni exprimován (Gierth et al., 2005), ačkoli jeho exprese v prýtu byla rovněž zjištěna (Rubio et al., 2000, Ahn et al., 2004). Délka květního stvolu nebyla odlišná od Col-0.

U *kup10*, který měl sníženou čerstvou hmotnost oproti kontrole, bylo zaznamenáno zkrácení květního stvolu, vzhledem k tomu, že tento trend nebyl pozorován u jiné linie, není možné předpokládat kauzalitu těchto veličin.

Jednotlivé mutantní linie se od sebe nelišily relativním obsahem vody. Vzhledem k tomu, že mezi nimi je i *hak5*, jehož úloha v rostlinách je dobře prozkoumána a není zapojen do reakce na stres suchem, je možné zamítnout zapojení jiného z testovaných přenašečů do odpovědi na stres suchem. Nepředpokládaná reakce všech mutantních linií je vysvětlitelná pouze tím, že použitá kompostová zemina má výrazně nižší obsah K^+ než je obvyklé, avšak to bude muset být ještě prověřeno.

5.4 Akumulace ^{134}Cs

Cs^+ je chemickým analogem K^+ a jako polutant je do rostlin přijímáno K^+ přenašeči (White a Broadley, 2000). Na příjmu Cs^+ se podílí především vysokoafinitní transportéry (Smolders et al., 1996), které nejsou příliš selektivní pro K^+ , jak bylo například ukázáno pro AtHAK5, který nerozlišuje mezi K^+ a Rb^+ (Rubio et al., 2008). Tento experiment byl tedy prováděn za účelem zjistit, zda některý ze studovaných transportérů není zapojen ve vysokoafinitním příjmu K^+ nebo v jeho translokaci do prýtu, která se dá radioizotopy snadno sledovat.

Schopnost linií akumulovat ^{134}Cs při 24 h inkubaci se ukázala jako veličina s velmi velkým rozptylem. ^{134}Cs bylo více akumulováno v kořenech rostlin, ačkoli signifikantní rozdíly nalézáme pouze u tří linií. Bez signifikantního rozdílu byly linie *hak5* a *kup7*, které měly výrazně sníženou akumulaci ^{134}Cs v kořenech. Další linií bez signifikantního rozdílu mezi rostlinnými částmi byl *kup10*, jehož akumulace v kořeni měla tak velký rozptyl, že o signifikantní rozdíl menší hodnoty byl prakticky vyloučen.

Linie *hak5* měla sníženou akumulaci ^{134}Cs v kořenech i v prýtu. Pro tuto linii se podařilo naměřit nižší akumulaci ^{137}Cs v semenáčcích *in vitro*, avšak u hydroponicky kultivovaných vyvinutých rostlin bylo naměřeno pouze nesignifikantní snížení (Qi et al., 2008). Ovšem tato kultivace byla pouze krátkodobá (20 min) a není mi známo, že by s linií *hak5* byly provedeny dlouhodobé kultivace. Transportér AtHAK5 je hlavním podezřelým co se týče zprostředkování transportu Cs^+ za nízkých koncentrací K^+ . Tvoří totiž téměř výhradní složku vysokoafinitního příjmu K^+ u *A. thaliana* a minimálně diskriminuje chemické homology K^+ (Rubio et al., 2008). Pokud by se tento výsledek podařilo zopakovat, jednalo by se o definitivní potvrzení zapojení AtHAK5 do příjmu Cs^+ .

Další linií se sníženou akumulací ^{134}Cs byla *kup7*, která ovšem neměla signifikantně sníženou akumulaci v prýtu. Snížená akumulace ^{134}Cs může naznačovat zapojení KUP7 v K^+ výživě. KUP7 je exprimován především v endodermis méně také v rhizodermis, což podporuje hypotézu o zapojení v příjmu K^+ (viz obrázek 7(bude v literatuře)). Tento transportér by mohl operovat

vysokoafinitně, s tím, že růstový fenotyp se na snížené dostupnosti K^+ neprojevil stejně, jako tomu bylo u *hak5-1* a *hak5-2*, či byl překryt aktivitou HAK5. Nebo by mohl operovat nízkoafinitně jak bylo prokázáno pro KUP1 (Fu a Luan, 1998, Kim et al., 1998). Vzhledem k předpěstování rostlin na $1 \mu M K^+$ je pravděpodobnější vysokoafinitní aktivita.

5.5 Transformace *Arabidopsis* konstruktem pKUP9::*GUS*

Pro lokalizaci genové exprese se dnes obvykle používají fúze s reportérovými geny. Fúze promotoru s *GUS* (β -glukuronidáza), jejíž enzymatická aktivita je později detekovatelná a umožňuje lokalizovat expresi na úrovni rostlinných pletiv. Pro detailnější lokalizaci na subcelulární úrovni se používá translačních fúzí proteinů s fluorescenčními proteiny (*GFP*, *RFP*, *YFP*).

Pro většinu *KT/HAK/KUP* transportérů byla jejich exprese zkoumána pouze pomocí genových čipů nebo analýz transkriptomu, přesnější analýzy pomocí reportérových genů chybí. Přesněji byla exprese pomocí fúzí s *GUS* a *GFP* určena pro *AtHAK5*, který je lokalizován na plazmatické membráně buněk primární kůry kořenů a rhizodermis (Gierth et al., 2005), dále potom pro *AtKUP4* = *TRH1*, který je lokalizován na bazálních plazmatických membránách buněk středního válce kořene a na membránových kompartmentech meristematické zóny kořene (Rigas et al., 2013). V neposlední řadě byl takto charakterizován *AtKUP6*, který působí na plazmatické membráně svěracích buněk a cévních svazků v nadzemních částech, v kořenech je lokalizován v pericyklu (Osakabe et al., 2013), exprese *AtKUP2* byla fúzí s *GUS* lokalizována do rostoucích částí rostlin (Elumalai et al., 2002).

Za účelem lokalizovat expresi *KUP9* na úrovni rostlinných pletiv a získat tak lepší vzhled do možné funkce *KUP9* v růstu postranních kořenů byla pro vedena transformace rostlin konstruktem pKUP9::*GUS*.

Sekvence promotorového úseku odhalila celkem 18 odlišných nukleotidů oproti sekvenci *Col-0*. Všechny tyto záměny byly určeny jako obvyklé záměny u jiných ekotypů *Arabidopsis thaliana*. Nepředpokládám tedy změnu exprese *KUP9* oproti *Col-0*.

Transformace proběhla úspěšně, avšak z časových důvodů nebylo možné transformované rostliny vyhodnotit. Vyhodnocení proběhne v rámci navazující disertační práce.

6 Závěr

V této diplomové práci se podařilo dokumentovat projevy vyřazení některých doposud nestudovaných AtKT/HAK/KUP transportérů. Mutant *kup5* produkoval více biomasy při nedostatku K^+ v *in vitro* kultivacích, což může znamenat funkci tohoto transportéru ve výdeji K^+ z buňky. Mutant *kup9* měl při nedostatku K^+ v *in vitro* kultivacích signifikantně kratší postranní kořeny než Col-0 a analýza anatomie špiček těchto kořenů ukázala znaky dřívější terminace apikálních meristémů. Vyhodnocení rostlin transformovaných pKUP9::GUS, by mohlo napomoci určit funkci KUP9 při růstu postranních kořenů.

Při vystavení suchu, měly všechny mutantní linie snížený relativní obsah vody, což naznačuje nezanedbatelnou funkci všech studovaných transportérů v K^+ homeostáze za přirozených podmínek.

Inkubace s radioizotopem ukázala fenotyp pro mutanty *kup7*, které akumulovaly méně Cs^+ a tedy jsou pravděpodobně zapojené ve vysokoafinitním příjmu K^+ .

7 Použitá literatura

- Ahn, S. J., Shin, R. a Schachtman, D. P. (2004). Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiology* **134**, 1135-1145.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V. a Rubio, F. (2009). Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K⁺ transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* **65**, 263-269.
- Andersen, A. J. (1967). Investigations on the plant uptake of fission products from contaminated soils. I. Influence of plant species and soil types on the uptake of radioactive strontium and caesium.
- Armengaud, P., Breitling, R. a Amtmann, A. (2004). The potassium-dependent transcriptome of Arabidopsis reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology* **136**, 2556-2576.
- Armengaud, P., Breitling, R. a Amtmann, A. (2010). Coronatine-insensitive 1 (COI1) mediates transcriptional responses of Arabidopsis thaliana to external potassium supply. *Molecular Plant* **3**, 390-405.
- Bañuelos, M. a. A., Garciadeblas, B., Cubero, B. a Rodríguez-Navarro, A. (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiology* **130**, 784-795.
- Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J.-Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., Mace, D., Ohler, U. a Benfey, P. N. (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**, 801-806.
- Broadley, M. R., Escobar-Gutiérrez, A. J., Bowen, H. C., Willey, N. J. a White, P. J. (2001). Influx and accumulation of Cs⁺ by the akt1 mutant of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. lacking a dominant K⁺ transport system. *Journal of Experimental Botany* **52**, 839-844.
- Broadley, M. R. a Willey, N. J. (1997). Differences in root uptake of radiocaesium by 30 plant taxa. *Environmental Pollution* **97**, 11-15.
- Buschmann, P. H., Vaidyanathan, R., Gassmann, W. a Schroeder, J. I. (2000). Enhancement of Na⁺ uptake currents, time-dependent inward-rectifying K⁺ channel currents, and K⁺ channel transcripts by K⁺ starvation in wheat root cells. *Plant Physiology* **122**, 1387-1398.
- Buyse, J., Van den Brande, K. a Merckx, R. (1996). Genotypic differences in the uptake and distribution of radiocaesium in plants. *Plant and Soil* **178**, 265-271.
- Caballero, F., Botella, M. A., Rubio, L., Fernández, J. A., Martínez, V. a Rubio, F. (2012). A Ca²⁺-sensitive system mediates low-affinity K⁺ uptake in the absence of AKT1 in Arabidopsis plants. *Plant and Cell Physiology* **53**, 2047-2059.
- Cao, S., Su, L. a Fang, Y. (2006). Evidence for involvement of jasmonic acid in the induction of leaf senescence by potassium deficiency in Arabidopsis. *Botany* **84**, 328-333.
- Cao, Y., Glass, A. D. a Crawford, N. M. (1993). Ammonium inhibition of Arabidopsis root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations aux1, axr1, and axr2. *Plant Physiology* **102**, 983-989.
- Cellier, F., Conéjéro, G., Ricaud, L., Luu, D. T., Lepetit, M., Gosti, F. a Casse, F. (2004). Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from Arabidopsis thaliana suggests a role in K⁺ homeostasis. *The Plant Journal* **39**, 834-846.
- Coskun, D., Britto, D. T., Li, M., Oh, S. a Kronzucker, H. J. (2013). Capacity and plasticity of potassium channels and high-affinity transporters in roots of barley and Arabidopsis. *Plant Physiology* **162**, 496-511.
- Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H. a Chérel, I. (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *The EMBO Journal* **16**, 3455-3463.

- Daras, G., Rigas, S., Tsitsekian, D., Iacovides, T. A. a Hatzopoulos, P. (2015). Potassium transporter TRH1 subunits assemble regulating root-hair elongation autonomously from the cell fate determination pathway. *Plant Science* **231**, 131-137.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. a Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**, 4777-4788.
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Sauer, N., May, S. T. a Hedrich, R. (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta* **216**, 334-344.
- Demidchik, V., Essah, P. A. a Tester, M. (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of Arabidopsis root cells. *Planta* **219**, 167-175.
- Desbrosses, G., Josefsson, C., Rigas, S., Hatzopoulos, P. a Dolan, L. (2003). AKT1 and TRH1 are required during root hair elongation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **54**, 781-788.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B. a Hedrich, R. (1997). Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal* **72**, 2143-2150.
- Dubrovsky, J., Soukup, A., Napsucially-Mendivil, S., Jeknić, Z. a Ivanchenko, M. (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* **103**, 807-817.
- Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H. a Thibaud, J. B. (2008). AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *The Plant Journal* **53**, 115-123.
- Edwards, K., Johnstone, C. a Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**, 1349.
- Elumalai, R. P., Nagpal, P. a Reed, J. W. (2002). A mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *The Plant Cell* **14**, 119-131.
- Epstein, E. a Hagen, C. (1952). A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology* **27**, 457.
- Epstein, E., Rains, D. a Elzam, O. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **49**, 684.
- Epstein, W. a Kim, B. S. (1971). Potassium transport loci in Escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology* **108**, 639-644.
- Fu, H.-H. a Luan, S. (1998). AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**, 63-73.
- Fuhrmann, M., Lasat, M. M., Ebbs, S. D., Kochian, L. V. a Cornish, J. (2002). Uptake of cesium-137 and strontium-90 from contaminated soil by three plant species; application to phytoremediation. *Journal of Environmental Quality* **31**, 904-909.
- Gassmann, W. a Schroeder, J. I. (1994). Inward-rectifying K⁺ channels in root hairs of wheat (a mechanism for aluminum-sensitive low-affinity K⁺ uptake and membrane potential control). *Plant Physiology* **105**, 1399-1408.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J.-B. a Sentenac, H. (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., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J. a Hedrich, R. (2009). Heteromeric AtKC1· AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K⁺-limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 21288-21295.

- Giannakopoulou, F., Haidouti, C., Chronopoulou, A. a Gasparatos, D. (2007). Sorption behavior of cesium on various soils under different pH levels. *Journal of Hazardous Materials* **149**, 553-556.
- Gierth, M. a Mäser, P. (2007). Potassium transporters in plants—involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS letters* **581**, 2348-2356.
- Gierth, M., Mäser, P. a Schroeder, J. I. (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.
- Golldack, D., Quigley, F., Michalowski, C. B., Kamasani, U. R. a Bohnert, H. J. (2003). Salinity stress-tolerant and-sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Molecular Biology* **51**, 71-81.
- Grabov, A. (2007). Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family—multiple functions. *Annals of Botany* **99**, 1035-1041.
- Graham, R. a Ulrich, A. (1972). Potassium Deficiency-induced Changes in Stomatal Behavior, Leaf Water Potentials, and Root System Permeability in Beta vulgaris L. *Plant Physiology* **49**, 105-109.
- Gupta, M., Qiu, X., Wang, L., Xie, W., Zhang, C., Xiong, L., Lian, X. a Zhang, Q. (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.
- Handley, R. a Overstreet, R. (1961). Effect of various cations upon absorption of carrier-free cesium. *Plant Physiology* **36**, 66.
- Hernandez, M., Fernandez-Garcia, N., Garcia-Garma, J., Rubio-Asensio, J., Rubio, F. a Olmos, E. (2012). Potassium starvation induces oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. roots. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1366-1374.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. a Sussman, M. R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-921.
- Hong, J.-P., Takeshi, Y., Kondou, Y., Schachtman, D. P., Matsui, M. a Shin, R. (2013). Identification and characterization of transcription factors regulating Arabidopsis HAK5. *Plant and Cell Physiology*, pct094.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D. a Véry, A.-A. (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.
- Hyun, T. K., Rim, Y., Kim, E. a Kim, J.-S. (2014). Genome-wide and molecular evolution analyses of the KT/HAK/KUP family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Genes & Genomics* **36**, 365-374.
- Chérel, I., Lefoulon, C., Boeglin, M. a Sentenac, H. (2014). Molecular mechanisms involved in plant adaptation to low K⁺ availability. *Journal of Experimental Botany* **65**, 833-848.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H. a Hedrich, R. (2001). K⁺ channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Letters* **508**, 463-469.
- Jung, J.-Y., Shin, R. a Schachtman, D. P. (2009). Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**, 607-621.
- Kellermeier, F., Chardon, F. a Amtmann, A. (2013). Natural variation of Arabidopsis root architecture reveals complementing adaptive strategies to potassium starvation. *Plant Physiology* **161**, 1421-1432.
- Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N. a Schroeder, J. I. (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *The Plant Cell* **10**, 51-62.
- Kim, M. J., Ruzicka, D., Shin, R. a Schachtman, D. P. (2012). The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2. 11 modulates plant response to low-potassium conditions. *Molecular Plant* **5**, 1042-1057.

- Kobayashi, D., Uozumi, N., HISAMATSU, S. i. a Yamagami, M. (2010). AtKUP/HAK/KT9, a K⁺ transporter from *Arabidopsis thaliana*, mediates Cs⁺ uptake in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 203-205.
- Kochian, L. V. a Lucas, W. J. (1982). Potassium transport in corn roots I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. *Plant Physiology* **70**, 1723-1731.
- Kumar, P. R., Jayaram, A. a Somashekar, R. (2009). Assessment of the performance of different compost models to manage urban household organic solid wastes. *Clean Technologies and Environmental Policy* **11**, 473-484.
- Lima, J. E., Kojima, S., Takahashi, H. a von Wirén, N. (2010). Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1; 3-dependent manner. *The Plant Cell* **22**, 3621-3633.
- Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, A. H. a Leyser, H. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**, 751-760.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. a Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 280-287.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M. a F., Simpson, J. a Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* **129**, 244-256.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Pérez-Torres, A., Rampey, R. A., Bartel, B. a Herrera-Estrella, L. (2005). An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* **137**, 681-691.
- Maathuis, F. a Sanders, D. (1994). Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 9272-9276.
- Maathuis, F. J. a Sanders, D. (1997). Regulation of K⁺ absorption in plant root cells by external K⁺: interplay of different plasma membrane K⁺ transporters. *Journal of Experimental Botany* **48**, 451-458.
- Martínez-Cordero, M. A., Martínez, V. a Rubio, F. (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Molecular Biology* **56**, 413-421.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F. J. a Sanders, D. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 1646-1667.
- Miller, E. M. a Nickoloff, J. A. (1995). *Electroporation Protocols for Microorganisms*, pp. 105-113: Springer.
- Munns, R. a Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651-681.
- Murashige, T. a Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Murray, M. a Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321-4326.
- Nieves-Cordones, M., Martínez-Cordero, M. A., Martínez, V. a Rubio, F. (2007). An NH₄⁺-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. *Plant Science* **172**, 273-280.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A. J., Alemán, F., Martínez, V. a Rubio, F. (2008). A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology* **68**, 521-532.

- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.-U. a Abo, M. (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**, 609-624.
- Payne, K. A., Bowen, H. C., Hammond, J. P., Hampton, C. R., Lynn, J. R., Mead, A., Swarup, K., Bennett, M. J., White, P. J. a Broadley, M. R. (2004). Natural genetic variation in caesium (Cs) accumulation by Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **162**, 535-548.
- Pervez, H., Ashraf, M. a Makhdum, M. (2004). Influence of potassium nutrition on gas exchange characteristics and water relations in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Photosynthetica* **42**, 251-255.
- Putyatin, Y. V., Seraya, T. M., Petrykevich, O. M. a Howard, B. J. (2006). Comparison of the accumulation of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr by six spring wheat varieties. *Radiation and Environmental Biophysics* **44**, 289-298.
- Pyo, Y. J., Gierth, M., Schroeder, J. I. a Cho, M. H. (2010). High-affinity K⁺ transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. *Plant Physiology* **153**, 863-875.
- Qi, Z., Hampton, C. R., Shin, R., Barkla, B. J., White, P. J. a Schachtman, D. P. (2008). The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **59**, 595-607.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. a Hedrich, R. (2002). AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 4079-4084.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M. a Gojon, A. (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2. 1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **140**, 909-921.
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K. A., Grabov, A., Dolan, L. a Hatzopoulos, P. (2001). TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. *The Plant Cell* **13**, 139-151.
- Rigas, S., Ditengou, F. A., Ljung, K., Daras, G., Tietz, O., Palme, K. a Hatzopoulos, P. (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.
- Rigol, A., Vidal, M. a Rauret, G. (2002). An overview of the effect of organic matter on soil-radiocaesium interaction: implications in root uptake. *Journal of Environmental Radioactivity* **58**, 191-216.
- Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M. a Martínez, V. (2010). Studies on Arabidopsis athak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K⁺ uptake. *Physiologia Plantarum* **139**, 220-228.
- Rubio, F., Fon, M., Ródenas, R., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Rivero, R. M. a Martínez, V. (2014). A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiologia Plantarum* **152**, 558-570.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F. a Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum* **134**, 598-608.
- Rubio, F., Santa-María, G. E. a Rodríguez-Navarro, A. (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum* **109**, 34-43.
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. G. a Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate

- developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **46**, 174-184.
- Santa-María, G. E., Danna, C. H. a Czibener, C. (2000). High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and-insensitive pathways. *Plant Physiology* **123**, 297-306.
- Santa-Maria, G. E., Rubio, F., Dubcovsky, J. a Rodríguez-Navarro, A. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell* **9**, 2281-2289.
- Sentenac, H. a Bonneaud, N. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**, 663.
- Shaw, G., Hewamanna, R., Lillywhite, J. a Bell, J. (1992). Radiocaesium uptake and translocation in wheat with reference to the transfer factor concept and ion competition effects. *Journal of Environmental Radioactivity* **16**, 167-180.
- Shin, R. a Schachtman, D. P. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8827-8832.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D. a Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* **37**, 501-506.
- Smolders, E., Kiebooms, L., Buysse, J. a Merckx, R. (1996). ¹³⁷Cs uptake in spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Tonic) at varying K supply. *Plant and Soil* **181**, 211-220.
- Smolders, E., Sweeck, L., Merckx, R. a Cremers, A. (1997). Cationic interactions in radiocaesium uptake from solution by spinach. *Journal of Environmental Radioactivity* **34**, 161-170.
- Spalding, E. P., Hirsch, R. E., Lewis, D. R., Qi, Z., Sussman, M. R. a Lewis, B. D. (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *The Journal of General Physiology* **113**, 909-918.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H. a Steinmeyer, R. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2917-2921.
- Vicente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan, L., Hatzopoulos, P. a Grabov, A. (2004). Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* **40**, 523-535.
- Wang, Y., He, L., Li, H.-D., Xu, J. a Wu, W.-H. (2010). Potassium channel α -subunit AtKC1 negatively regulates AKT1-mediated K⁺ uptake in *Arabidopsis* roots under low-K⁺ stress. *Cell Research* **20**, 826-837.
- White, P. J. a Broadley, M. R. (2000). Tansley Review No. 113. *New Phytologist* **147**, 241-256.
- WHO, (1999). Potassium in drinking water.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. a Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one* **2**, e718-e718.
- Xu, J., Li, H.-D., Chen, L.-Q., Wang, Y., Liu, L.-L., He, L. a Wu, W.-H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* **125**, 1347-1360.
- Zhang, Z., Zhang, J., Chen, Y., Li, R., Wang, H. a Wei, J. (2012). Genome-wide analysis and identification of HAK potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.). *Molecular Biology Reports* **39**, 8465-8473.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A. a Wilkins, B. (2000). Effect of potassium starvation on the uptake of radiocaesium by spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Tonic). *Plant and Soil* **220**, 27-34.

Zimmermann, S., Talke, I., Ehrhardt, T., Nast, G. a Müller-Röber, B. (1998). Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiology* **116**, 879-890.