

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Jana Pohl**

Vliv hliníkové toxicity na dynamiku rostlinných kortikálních mikrotubulů  
Aluminium toxicity effects on dynamics of plant cortical microtubules

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Kateřina Schwarzerová, PhD.

Praha, 2017

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji své školitelce Kateřině Schwarzerové nejen za trpělivost, kterou se mnou měla během sepisování této diplomové práce, ale také za cenné rady, které mi dopomohly tuto práci dokončit.

Dále bych chtěla poděkovat celému týmu laboratoře 204. Všichni byli velice přátelští a kdykoli jsem si nevěděla rady, byli ochotni mi pomoci.

## ABSTRAKT

Toxicita hlinitých iontů je hlavním faktorem omezujícím růst rostlin na kyselých půdách. Hliník inhibuje růst kořenů během několika minut po ošetření. Mechanismus a primární cíl jeho působení je doposud neznámý.

V této diplomové práci byl studován vliv hliníkové toxicity na dynamiku kortikálních mikrotubulů u WT a *plda1* rostlin pomocí EB1a-GFP markeru. Aplikace hlinitých iontů vedla k okamžitému nárůstu rychlosti polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů v elongační i tranzientní zóně kořene. Nicméně mikrotubuly tranzientní zóny jsou mnohem citlivější vůči působení hlinitých iontů, protože naměřený nárůst rychlosti polymerace vyvolaný hlinitými ionty byl vyšší než v zóně elongační.

Rostliny postrádající enzym PLD $\alpha$ 1 vykazovaly mnohem vyšší dynamiku na plus koncích kortikálních mikrotubulů oproti WT během AlCl<sub>3</sub> stresu, což jim umožňovalo rychleji reagovat na stresové podmínky. Mutanty se lépe vyrovnávaly s hlinitými ionty a 100  $\mu$ M koncentrace měla u *plda1* dokonce benefiční vliv na růst kořenů oproti působení pouze nízkého pH.

Z výsledků usuzuji, že enzym PLD $\alpha$ 1 ovlivňuje dynamiku mikrotubulů. Mikrotubuly *plda1* rostlin byly dynamičtější, rychleji polymerovaly v odpovědi na hlinité ionty, díky čemuž byly odolnější vůči stresu. Změny v dynamice mikrotubulární sítě by mohly být důležitým faktorem při odpovědi rostlin na stres vyvolaný hlinitými ionty.

*Klíčová slova:*

*Toxicita hliníku, dynamika mikrotubulů, rychlost polymerace, EB1a-GFP, PLD $\alpha$ 1.*

## ABSTRACT

Aluminium toxicity is the main factor limiting plant growth on acid soils. Aluminium inhibits root growth within few minutes after aluminium treatment. The mechanism and primary target of his action is still unknown.

In this diploma thesis the effect of aluminium toxicity on dynamics of cortical microtubules WT and *plda1* plants was studied using the EB1a-GFP marker. Polymerization rate in both the transition and the elongation zone increased immediately after the application of aluminium. Nevertheless, microtubules in the transition zone are much more sensitive to aluminium, because the aluminium-induced increase in the polymerization rate was higher than in the elongation zone.

Plants lacking PLD $\alpha$ 1 showed higher dynamics on plus ends of cortical microtubules compared to WT during aluminium stress, which enabled them to react faster to stress stimuli. Mutants showed lower sensitivity to aluminium and 100  $\mu$ M concentration of aluminium ions has beneficial effect on root growth in *plda1*.

These results suggest that PLD $\alpha$ 1 influences microtubule dynamics. Microtubules in *plda1* plants were more dynamic and they polymerized faster in the response to aluminium, which was accompanied by decreased sensitivity to aluminium stress compared to WT. Changes in microtubule dynamics may play a role in aluminium stress response in plants.

*Key words:*

*Aluminium toxicity, microtubule dynamics, polymerization rate, EB1a-GFP, PLD $\alpha$ 1.*

# OBSAH

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>1</b>	<b>ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>4</b>
2.1	Mikrotubuly a jejich dynamika .....	4
2.2	MAPs.....	5
2.2.1	MAP65.....	6
2.2.2	Katanin.....	6
2.2.3	$\gamma$ -tubulin.....	6
2.2.4	EB1 .....	7
2.2.5	MAP215.....	7
2.2.6	SPIRAL1.....	8
2.2.7	PLDs .....	8
2.3	Dynamika mikrotubulů a fosfolipidová signální dráha.....	9
2.4	Hliník.....	11
2.5	Toxicita hliníku .....	12
2.5.1	Toxicita hliníku a její vliv na mikrotubuly .....	14
2.5.2	Mechanismus tolerance a rezistence rostlin vůči toxicitě hlinitých iontů .....	16
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>17</b>
3.1	Rostlinný materiál .....	17
3.2	Metody .....	17
3.2.1	Elektroporace vektoru EB1-GFP do <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	17
3.2.2	Transformace rostlin metodou floral-dip.....	18
3.2.3	Selekce rostlin s GFP-markerem .....	18
3.2.4	Tranzientní transformace .....	18
3.2.5	Křížení rostlin .....	19
3.2.6	Genotypování.....	20
A.	Izolace DNA pro PCR.....	20
B.	Amplifikace DNA metodou PCR.....	20
C.	Elektroforéza .....	21
3.2.7	Hydroponická kultivace rostlin.....	21
3.2.8	Růstová analýza kořenů .....	22

3.2.9	Sledování dynamiky kortikálních mikrotubulů .....	23
3.2.10	Zjišťování přítomnosti hliníku v trichomech pomocí Morinu .....	24
3.2.11	Izolace protoplastů .....	25
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>28</b>
4.1	Marker EB1-GFP v rostlinách <i>Arabidopsis</i> .....	28
4.2	Růstová analýza kořenů .....	30
4.3	Vliv hlinitých iontů na dynamiku kortikálních mikrotubulů elongační a transientní zóny kořene .....	32
4.4	Pozorování dynamiky kortikálních mikrotubulů v čase .....	33
4.5	Studium změn počtu kortikálních mikrotubulů .....	38
4.6	Toxicita hliníku a orientace kortikálních mikrotubulů .....	40
4.7	Protoplasty a dynamika kortikálních mikrotubulů .....	45
4.8	Studium akumulace hliníku v kroužku Ortmannové .....	47
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
5.1	Modelový materiál .....	49
5.2	Růstová analýza kořenů .....	49
5.3	Dynamika kortikálních mikrotubulů transientní a elongační zóny kořene .....	50
5.4	Pozorování dynamiky kortikálních mikrotubulů v čase .....	51
5.4.1	Rychlost polymerace na + konci je za kontrolních podmínek u WT a <i>plda1</i> velmi podobná .....	52
5.4.2	Mikrotubuly reagují spíše na změnu pH než hlinité ionty během prvních 3 minut působení .....	52
5.4.3	Rychlost polymerace cMTs se po delším působení 300 $\mu$ M AlCl <sub>3</sub> výrazněji zvyšuje u <i>plda1</i> .....	52
5.4.4	100 $\mu$ M AlCl <sub>3</sub> má u <i>plda1</i> benefiční účinky .....	54
5.5	Studium změn počtu kortikálních mikrotubulů .....	54
5.6	Vliv toxicity hliníku na orientaci kortikálních mikrotubulů .....	56
5.7	Dynamika cMTs v protoplastech buněk .....	57
5.8	Studium akumulace hliníku v kroužku Ortmannové .....	57
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>59</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	adenosintrifosfát
CESA	celulóza syntáza
cMTs	kortikální mikrotubuly
CSII	celulóza syntéza interakční protein 1
DAG	diacylglycerol
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB1	end binding protein 1
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GCP	proteiny $\gamma$ -tubulinového komplexu
GFP	zelený fluorescenční protein
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
$\gamma$ -TURC	gamma-tubulinový komplex ve tvaru prstence
MAP	proteiny asociované s mikrotubuly
MS	Murashige a Skoog
MTOC	mikrotubuly organizující centrum
MTs	mikrotubuly
NAE	N-acyletanolamin
Nrat1	transportér hliníku u rýže
PA	kyselina fosfatidová
PCD	programovaná buněčná smrt
PC-PLC	fosfatidylcholin-hydrolyzující fosfolipáza C
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-4,5-bifosfát
PLA	fosfolipáza A
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PM	plazmatická membrána



PME	pektinmetylesteráza
WT	wild type
YEB	Yeast extract broth

# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Toxicita hlinitých iontů je hlavním faktorem limitujícím růst rostlin na kyselých půdách (cca 35% obdělávatelné půdy). Primárním projevem toxicity hliníku je rychlé zastavení kořenového růstu, ke kterému dochází v rámci minut. Přestože je tomuto fenoménu věnována pozornost již dlouho, doposud není znám mechanismus jeho působení. Dlouhotrvající stres vyvolaný hlinitými ionty může vést ke změnám morfologie kořene a odumírání buněk.

Hliník se váže do apoplastu a pozměňuje vlastnosti plazmatické membrány (depolarizace), narušuje aktivní transport iontů, homeostázi vápníku, ovlivňuje cytoskelet (rychlá reorganizace kortikálních mikrotubulů). Předpokládá se, že nedochází k přímé interakci hlinitých iontů s mikrotubuly, ale spíše je ovlivněna signální dráha, která s mikrotubuly úzce souvisí.

Fosfolipidová signální dráha je jeden ze základních mechanismů, který je aktivován při různých stresových situacích, jako je sucho, chlad, salinita, napadení patogenem. Aktivace této dráhy vede k hydrolýze fosfolipidů fosfolipázami, které se dělí do tří skupin: fosfolipáza A (PLA), fosfolipáza C (PLC) a fosfolipáza D (PLD). U *Arabidopsis* bylo klasifikováno celkem 12 fosfolipáz D, které se dále dělí do 6 tříd ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $\zeta$ ). PLD $\delta$  a PLD $\alpha$  jsou si nejvíce podobné jak strukturou, tak funkcí. U rostlin jsou silně exprimovány. V některých stresových situacích mohou společně spolupracovat či se doplňovat (např. zasolení, ale tak chlad, sucho – obecně osmotický stres).

PLD $\delta$  asociuje s mikrotubuly a je považován za spojník mezi mikrotubuly a membránou. Doposud nebylo prokázáno, že by PLD $\alpha$  přímo interagovala s mikrotubuly, přesto *plda* knockout mutanti jsou citlivější vůči oryzalinu, který depolymeruje mikrotubuly. Ztráta PLD $\alpha$  vede k více narušeným mikrotubulům v první fázi reakce rostliny na stres zasolením oproti kontrolním rostlinám. Exogenní aplikací kyseliny fosfatidové jsou mikrotubuly u *plda* mutantů vystavených stresu zasolením stabilnější a zvyšuje se jejich tolerance vůči stresu zasolením.

Mikrotubuly jsou vysoce dynamické struktury, jejichž základní stavební jednotkou jsou  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinové dimery. V buňce mají nespočet funkcí. Podílejí se na jaderném a buněčném dělení, na vnitřním uspořádání buňky. Zajišťují pohyb váčků, organel a dalších buněčných struktur. Již v roce 1974 vyřkl Heath hypotézu, že existuje spolupráce

mezi membránově vázanými komplexy a mikrotubuly v průběhu syntézy buněčné stěny. Dnes je známo, že kortikální mikrotubuly udávají orientaci celulósových mikrofibril. Interakce mezi CESA komplexy a kortikálními mikrotubuly je zprostředkována přes CSII (CESA interactive protein 1).

Dynamika a uspořádání mikrotubulů jsou regulovány řadou proteinů. Některé z nich se vážou na plus konec mikrotubulů (EB1, SPIRAL1), jiné na minus konec ( $\gamma$ -tubulin). Mohou svazkovat mikrotubuly (MAP65) nebo je štípat (katanin).

Cíle práce:

- 1) Porovnání vlivu hlinitých iontů na dynamiku kortikálních mikrotubulů kořenových buněk mezi WT, *pld1* a *pld2*.
  - a) Porovnat dynamiku kortikálních mikrotubulů v transienční a elongační zóně kořene.
  - b) Zjistit zdali se mění rychlost polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů v čase po aplikaci hlinitých iontů.
  - c) Zjistit zdali dochází ke změnám uspořádání (reorganizaci) mikrotubulů po aplikaci hlinitých iontů.
  - d) Zjistit zdali se mění počet mikrotubulů v čase po ošetření hlinitými ionty.
- 2) Pozorování dynamiky + konců mikrotubulů v protoplastech buněk.
- 3) Studium akumulace hliníku v kroužku Ortmannové, specifické kalózové struktury na bázi trichomu *Arabidopsis* ve spolupráci s Mgr. Ivanem Kulichem, Ph.D.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

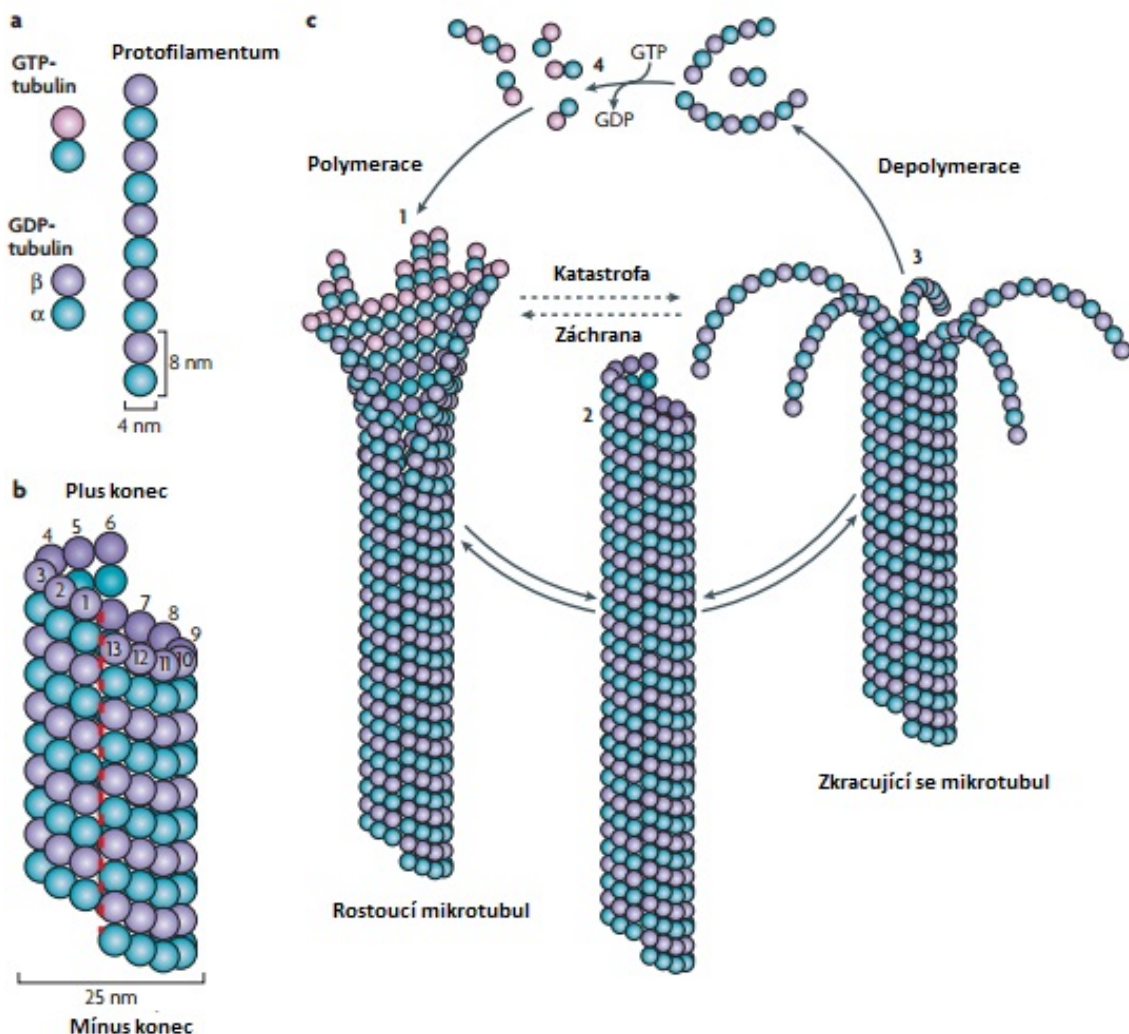
### 2.1 Mikrotubuly a jejich dynamika

Mikrotubuly (MTs) jsou polymery  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinových heterodimerů. Dimery spolu vytvářejí dlouhé řetězce, protofilamenta. Každý MT je složen ze 13 protofilament, které tvoří dutý válec o vnějším průměru 25 nm. Mikrotubuly jsou polarizované, mají plus a minus konec, a velmi dynamické struktury. U většiny eukaryot je minus konec stabilní a je zakotven v mikrotubuly organizujícím centru (MTOC), zatímco plus konec je volný a vykazuje dynamickou nestabilitu (Schmit, 2002). MTs podléhají neustálé polymeraci a depolymeraci. Během polymerace mikrotubulu se tubulinové podjednotky s navázaným GTP napojují na rostoucí konec mikrotubulu. Následně je GTP hydrolyzováno. Pouze GTP-čepička na plus konci mikrotubulu je tvořena tubulinovými podjednotkami s navázaným GTP. Pokud převažuje hydrolyza GTP na GDP nad připojováním tubulinových podjednotek s GTP, dochází ke ztrátě GTP-čepičky a mikrotubul rychle depolymeruje (Walker *et al.*, 1989). Obecně je přechod z fáze růstu do fáze zkracování nazýván katastrofa a opačný jev pak „záchrana“ (Chi a Ambrose, 2016).

Pokud není minus konec zakotven v MTOC, může docházet při určité koncentraci tubulinových podjednotek k jejich přidávání na plus konci a ztrátě podjednotek na konci opačném. Tento jev je nazýván treadmilling (Vassileva *et al.*, 2005).

Kortikální mikrotubuly (cMTs) u *Arabidopsis* vykazují jak dynamickou nestabilitu, tak treadmilling. Minus konec je volný a podléhá pomalé depolymeraci střídající se s fázemi, kdy je neaktivní, zatímco plus konec polymeruje. Tento typ dynamiky cMTs byl pozorován také u buněčné kultury tabáku, je považován za společný rys vyšších rostlin a je nazýván hybridní treadmilling (Vassileva *et al.*, 2005).

Vzhledem k tomu, že cMTs jsou omezeny pouze na rovinu plasmatické membrány a jsou vysoce dynamické, je větší pravděpodobnost jejich vzájemné interakce. Tyto interakce pak ovlivňují uspořádání cMTs a patří mezi ně: tvorba svazků, katastrofa vyvolaná srážkou dvou MTs, štěpení MTs a nukleace z již existujících MTs. V případě, že rostoucí cMT narazí na jiný cMT je rozhodující úhel, pod kterým přišly do kontaktu. Úhel menší než  $40^\circ$  vede přednostně k reorientaci plus konce rostoucího cMT a tvorbě svazku. Při střetu pod větším úhlem cMT buď depolymerizuje nebo se s druhým cMT překříží (Chi and Ambrose, 2016).



**Obr. 1** – Struktura mikrotubulu a jeho dynamika (převzato a upraveno z Akhmanova a Steinmetz, 2008).

## 2.2 MAPs

MAPs je skupina proteinů asociujících s mikrotubuly, které ovlivňují organizaci a dynamiku mikrotubulů, buněčný transport. Označení MAPs je dnes využíváno nejen pro proteiny, které přímo interagují s MTs, ale také pro proteiny, které se nepřímo či přechodně váží na MTs nebo s nimi *in vivo* kolokalizují.

MAPs můžeme podle funkce rozdělit na: svazkující, destabilizující, vázající se na plus (+TIPS) a minus konec mikrotubulů, molekulové motory a další.

Já se dále zaměřím pouze na MAPs, které ovlivňují dynamiku kortikálních mikrotubulů.

### 2.2.1 MAP65

MAP65 je rodina proteinů, které polymerují a svazkují mikrotubuly. V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 9 MAP65 genů různých funkcí. MAP65-1, -2, -5 a MAP65-8 převážně asociují s kortikálními mikrotubuly (Lucas *et al.*, 2011).

MAP65-1 se váže na mikrotubuly a svazuje je, čímž se vytvářejí mezi MTs 25-nm můstky a tím jsou stabilizovány. Oblast vázající MTs se nachází na C-terminálním konci proteinu a esenciálními aminokyselinami pro interakci s MTs jsou Ala409 a Ala420. N-konec proteinu je zodpovědný za jeho dimerizaci (Smertenko *et al.*, 2004). Svazky generované AtMAP65-1 jsou více rezistentní jak vůči mikrotubuly-depolymerujícím drogám, tak depolymeraci vyvolanou stresem, jako je např. chlad (Pleskot *et al.*, 2013).

*Plejade* je mutace v AtMAP65-3 genu. Pro mutanty jsou typické zvětšené buňky, narušená cytokineze. Karyokineze není ovlivněna. Zajímavé je, že AtMAP65-3 je exprimován ve všech rostlinných orgánech, ale narušená cytokineze byla pozorována pouze v kořenech (Müller *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Katanin

Katanin je konzervovaný protein, který se vyskytuje ve formě heterodimeru. Skládá se z menší katalytické podjednotky p60 (60kDa), která je nezbytná pro štípání MTs, a větší regulační podjednotky p80 (80kDa). p60 vytváří prstencovité hexametry a pro štípání MTs využívá hydrolýzy ATP (Stoppin-Mellet *et al.*, 2006).

### 2.2.3 $\gamma$ -tubulin

$\gamma$ -tubulin je konzervovaný protein u eukaryot, který zajišťuje nukleaci mikrotubulů. Je součástí mikrotubuly-organizujících center (MTOC). MTOC tvoří  $\gamma$ -tubulin ring complex ( $\gamma$ -TuRC) a malý  $\gamma$ -tubulin complex ( $\gamma$ -TuSC). Proteiny, které tvoří komplexy, se nazývají gamma-tubulin complex proteins, zkráceně GCPs (Binarová *et al.*, 2006). Po objevení  $\gamma$ -TuRC byly navrženy dva modely vysvětlující nukleaci MTs – templátový a model protofilament. Podle templátového modelu funguje  $\gamma$ -TuRC jako předloha pro sestavování tubulinových podjednotek. Každý  $\gamma$ -TuRC obsahuje 13 tubulinových podjednotek, které mezi sebou laterálně interagují a vytvářejí tak základnu pro nasedající  $\alpha/\beta$ -tubulinové dimery. Model protofilament předpokládá longitudinální interakci mezi

jednotlivými tubulinovými podjednotkami. Vytvoří se tak první protofilamentum, na které dále  $\alpha/\beta$ -tubulinové dimery nasedají jak laterálně, tak podélně (Moritz *et al.*, 2000). Mikrotubuly jsou polarizované, mínus koncem jsou zakotveny v prstenci z  $\gamma$ -tubulinových podjednotek a plus konec je vystaven (roste) do cytoplasmy.

#### **2.2.4 EB1**

EB1 spadá do skupiny proteinů asociovaných s MTs, který se přednostně akumuluje na rychle rostoucím (+) konci MT. Kromě mikrotubulů, EB1 interaguje také s mnoha dalšími proteiny, kdy mnoha z nich patří mezi +TIPS (Bisgrove *et al.*, 2008). Na rostoucím plus konci MT vytváří typické struktury zvané komety (Chan *et al.*, 2003).

EB1 je relativně malý protein (32 kDa) s konzervovanou strukturou. Na N-terminálním konci se nachází kalponinu podobná doména (CH doména) potřebná pro vazbu proteinu na + konec MT (Hayashi a Ikura, 2003). Na C-terminálním konci se nachází coiled-coil doména (CC doména) nezbytná pro dimerizaci proteinu (Liu a Han, 2015).

*Arabidopsis* má 3 izoformy EB1 proteinu: EB1a, EB1b a EB1c. EB1a a EB1b jsou si sekvenčně velmi podobné a vážou se na plus konec MTs během celého buněčného cyklu. EB1c kolokalizuje pouze s MT dělicího vřetenka a fragmoplastu (Bisgrove *et al.*, 2008).

Přesto, že je EB1 protein intenzivně studován, není známá jeho přesná funkce. Podle Sandblad *et al.*, 2006 homolog EB1 u kvasinek propojuje tubulinová protofilamenta v tubulární struktury.

Van Damme *et al.* (2004b) zjistily, že overexpresí EB1a se zvyšuje rychlost polymerace MTs, ale EB1b ne.

#### **2.2.5 MAP215**

MAP215 proteiny (TOGp u lidí, Msps u *Drosophily*, ZYG-9 u *C. elegans*, Stu2 u *S. cerevisce*, Dis1 či Alp14 u *S. pombe*, CP224 u *Dictiostelium*, MOR1 u *Arabidopsis*) jsou zřejmě nejhojnější a nejvíce konzervovanou skupinou mezi MAPs. MOR1 stabilizuje

kortikální mikrotubuly tím, že podporuje polymeraci tubulinu na + konci MT (Kawamura a Wasteneys, 2008).

*mor1-1* je teplotně senzitivní mutace projevující se narušením sítě kortikálních mikrotubulů při nepříznivých teplotních podmínkách (nad 28°C). Typickým znakem jsou fragmentované cMTs (Hamada *et al.*, 2004).

### 2.2.6 SPIRAL1

SPR1 kóduje rostlinně specifický protein o délce 119 aminokyselin, který kolokalizuje s cMTs. SPR1 protein fúzovaný s GFP se koncentruje na + konci cMTs, na základě čehož jej řadíme do skupiny +TIPs. Kromě SPR1 bylo v genomu *Arabidopsis* identifikováno 5 SPIRAL1-LIKE genů, SP1L1-SP1L5 (Nakajima *et al.*, 2006). Podle Galva *et al.* (2014) SPR1 a EB1b protein soupeří o stejné vazebné místo na cMTs.

Pro *spr1* mutanty je charakteristické pravotočivé stáčení růstu kořenů. Ošetření mutantů MT-depolymerující drogou propyzamidem a MT-stabilizující drogou taxolem vedlo v obou případech k levotočivému stáčení růstu kořenů (Furutani *et al.*, 2000).

### 2.2.7 PLDs

Fosfolipidy jsou deriváty kyseliny fosfatidové. Kromě toho, že jsou stavebními kameny buněčných membrán, mají také funkci signálních molekul a jsou zapojeny v různých vývojových procesech rostliny jako je klíčení, růst pylové láčky, PCD či senescence. S fosfolipidy úzce souvisí fosfolipázy (PL), tedy enzymy, které je štěpí (např. fosfatidylcholin na kyselinu fosfatidovou a cholin). Fosfolipázy můžeme rozdělit do tří skupin: fosfolipáza A (PLA), fosfolipáza C (PLC) a fosfolipáza D (PLD) (Ruelland *et al.*, 2015).

U *Arabidopsis* bylo identifikováno celkem 12 genů pro PLD, které se dále dělí do 6 tříd ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $\zeta$ ). PLD dále můžeme rozdělit do dvou podrodin, PX/PH-PLD a C2-PLD, na základě přítomnosti lipid-vazebné domény na N-terminální sekvenci (Eliáš *et al.*, 2002). C2-PLD je  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidy vázající doména a PX/PH jsou phox a plekstrin homologní domény vázající fosfoinositidy. Je známo, že vápenaté ionty a fosfoinositidy jsou klíčovými regulátory těchto enzymů, přesto byly však objeveny izoformy vykazující nezávislost vůči  $\text{Ca}^{2+}$  (Qin *et al.*, 2002 a Eliáš *et al.*, 2002). 10 z 12 PLDs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ )



obsahují C2 doménu, PLD $\zeta$  mají PX/PH domény, které jsou přítomny také u savčích PLDs (Wang, 2005). PLD $\alpha$  a PLD $\delta$  jsou si strukturálně nejvíce podobné. V mnoha stresových situacích spolu kooperují, zejména při osmotickém stresu. Při stresu zasolením, rostliny postrádající PLD $\alpha$  nebo PLD $\delta$  jsou citlivější vůči stresu, zároveň se snižuje hladina kyseliny fosfatidové oproti WT. *pld $\alpha$ 1pld $\delta$*  double mutanti vykazují ještě větší senzitivitu vůči stresu zasolením než single mutanti či WT (Lin *et al.*, 2014).

## 2.3 Dynamika mikrotubulů a fosfolipidová signální dráha

Rostliny se v přírodě musí denně vypořádávat s různými biotickými i abiotickými stresory. V mnoha případech odpověď rostliny na stres vede ke změnám PLD aktivity a produkci kyseliny fosfatidové (PA). Podle nedávných výsledků je cytoskelet hlavním cílem PLD-PA signalizace.

Dhonukshe *et al.* (2003) testovali, zdali aktivaci PLD pomocí n-butanolu dojde ke změně uspořádání kortikálních mikrotubulů. Po 30 minutách ošetření n-butanolem byly cMTs uvolněny z plazmatické membrány a částečně depolymerovaly. Použití jiných izoform n-butanolu nemělo žádný vliv na dynamiku mikrotubulů.

Motes *et al.* (2005) chtěli zjistit, zdali různé izoformy PLDs mají odlišný efekt na uspořádání MTs. Kromě 1-butanolu se rozhodli použít také N-acylethanolamin (NAE), který je známý jako inhibitor PLD $\alpha$ . Po delším vystavení (72 hodin) NAE došlo k reorganizaci mikrotubulů, ale nebyla zaznamenána jejich depolymerace. Ošetření 1-butanolem vedlo přednostně k depolymeraci MTs (fragmentované MTs, difúzní fluorescence).

Již dlouho je známo, že kortikální mikrotubuly jsou asociovány s plazmatickou membránou (PM). PLD je horkým kandidátem, ale toto spojení bývá často zpochybňováno. Existují však důkazy naznačující možnost této interakce. Prvním z nich je izolace 90 kDa proteinu z plazmatické membrány BY-2 – tabákových buněk, vykazující sekvenční podobnost s *Arabidopsis* PLD $\delta$ , který byl asociován s mikrotubuly (Gardiner *et al.*, 2001). Dalším důkazem je spojitost mezi aktivitou PLD a dynamikou MTs. Po ošetření 1-butanolem (inhibitor PLD) došlo k částečné depolymeraci cMTs a jejich odpojení od PM (Dhonukshe *et al.*, 2003). Potocký *et al.* (2003) pozorovali po použití taxolu (MT-stabilizující droga, do koncentrace 4  $\mu$ M) obnovení růstu pylových láček, u kterých byla PLD inhibována 1-butanolem. Zřejmě tedy PLD isoformy citlivé vůči butanolu a

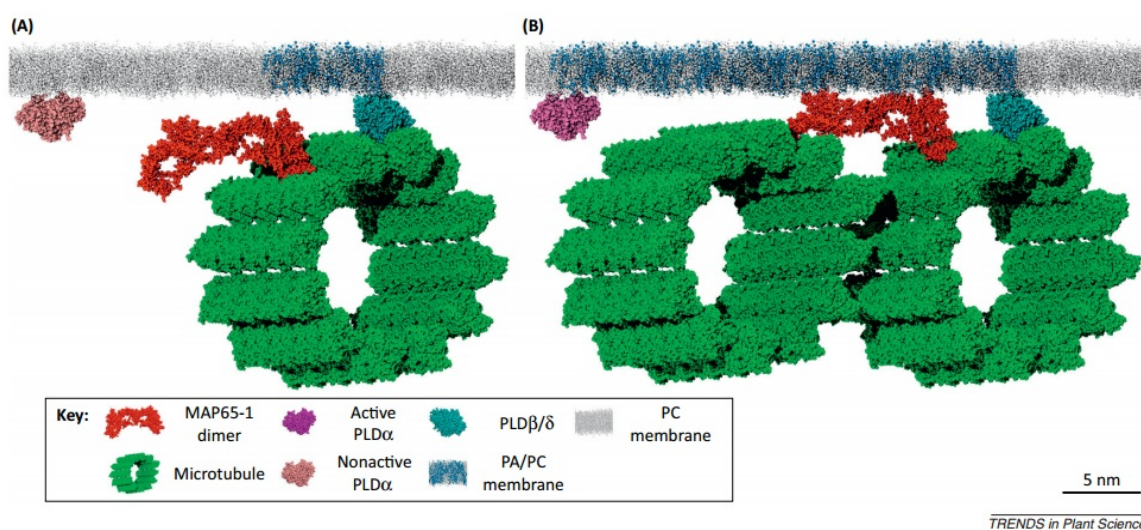
podílející se na růstu pylových láček funkčně asociují s cytoskeletem. Na základě těchto výsledků se začalo spekulovat o tom, že PLD by mohla být linkerem mezi PM a mikrotubuly.

Kromě PLD se na regulaci dynamiky mikrotubulů podílí také kyselina fosfatidová. PA je signální fosfolipid, podílející se na stresové odpovědi při zranění, napadení patogenem, osmotickém stresu (zasolení, chlad, sucho). Nezbytná je také při regulaci expanze buněk kořenových vlásků a pylové láčky. Gardiner *et al.* (2003) po použití 1-butanolu (specifický inhibitor PLD-dependenční produkce PA) pozorovali u mladých semenáčků *Arabidopsis* narušenou organizaci kortikálních mikrotubulů, nabubření buněk elongační zóny kořene, větvené kořenové vlásky. Jiné izoformy neměly vliv na organizaci mikrotubulů, klíčení semen či růst rostlin. Zdá se, že produkce kyseliny fosfatidové fosfolipázou D je nezbytná pro normální uspořádání mikrotubulů a pro normální růst *Arabidopsis*. Pejchar *et al.* (2008) testovali, zdali stabilizace či destabilizace mikrotubulů bude mít vliv na produkci PA. Využili k tomu mikrotubulární drogy, taxol a oryzalin a došli k zajímavým výsledkům. Zatímco stabilizace mikrotubulů taxolem vedla ke zvýšení produkce PA, ošetření oryzalinem nemělo žádný vliv.

Ačkoli se PA nemůže vázat přímo na tubulin, zřejmě využívá další PA-vazebné proteiny k přenosu signálu vedoucího k reorganizaci cytoskeletu. Podle nedávné studie PA přímo interaguje s MAP65-1 (Zhang *et al.*, 2012). AtMAP65-1 přednostně interaguje s PA (produkt PLD), což vede ke zvýšení jeho aktivity, následuje vazba na MTs, polymerace tubulinu a svazkování MTs.

V této signální dráze sehraje roli také PLD $\alpha$ 1. Přesto, že nebyla prokázána přímá vazba PLD $\alpha$ 1 na MT, jsou kortikální mikrotubuly u *plda1* knockout mutantů mnohem citlivější vůči oryzalinu (cytoskeletální droga depolymerující MT). U rostlin postrádajících PLD $\alpha$ 1, vystavených stresu zasolením, byly pozorovány vážně narušené mikrotubuly oproti kontrolním rostlinám. Exogenní aplikací PA došlo ke stabilizaci mikrotubulů, a zvýšení jejich tolerance vůči stresu zasolením. PLD $\alpha$ 1 je zapojena také do obnovení upořádání mikrotubulů po depolymeraci vyvolané stresem. Jakmile byly WT rostliny vystavené stresu zasolením přemístěny do růstového média bez NaCl, došlo k obnovení uspořádání mikrotubulů. Kortikální mikrotubuly u *plda1* mutantů zůstaly narušené (Zhang *et al.*, 2012).

Jak je tedy zřejmě regulován mikrotubulární cytoskelet kyselinou fosfatidovou? Za normálních podmínek je PLD $\alpha$ 1 neaktivní a dimer MAP65-1 je navázán na mikrotubuly. Mikrotubuly jsou připojeny k membráně přímou interakcí s PLD $\delta$ . Při stresu zasolením se aktivuje PLD $\alpha$ 1. V případě, že není napojena na membránu, tak je rekrutována k membráně. Následuje zvýšení lokální koncentrace kyseliny fosfatidové v lipidové dvojvrstvě. MAP65-1 je přichycen k membráně a PA zvyšuje jeho mikrotubuly stabilizující a svazující aktivitu (Pleskot *et al.*, 2013). Pro názornější představu je přiložen obrázek popisující situaci za normálních (a) a stresových (b) podmínek.



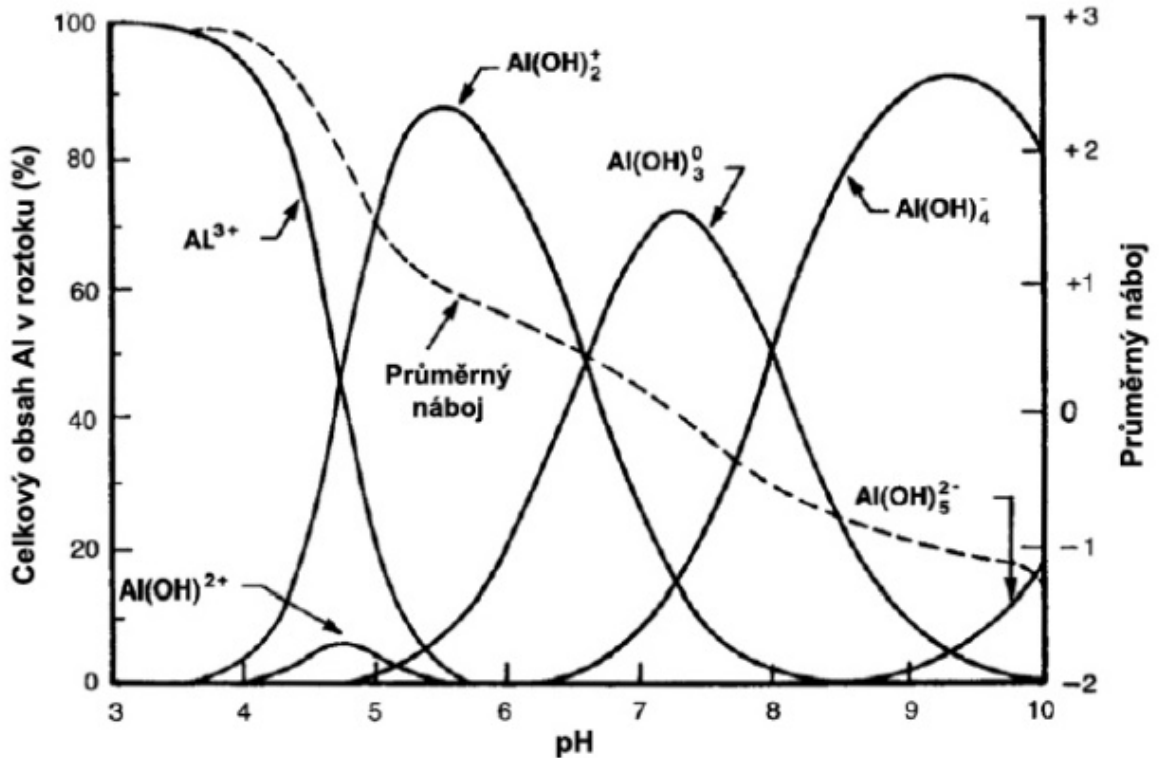
**Obr. 2** – Model regulace mikrotubulárního cytoskeletu pomocí PLD, PA a MAP65-1 (převzato z Pleskot *et al.*, 2013).

## 2.4 Hliník

Hliník je lehký kov bělavě šedé barvy, který je nejvíce zastoupeným kovovým prvkem v zemské kůře. Díky jeho vysoké reaktivitě se v přírodě můžeme setkat především s jeho sloučeninami, nejznámější z nich je bauxit  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ . Snižování pH vede k uvolňování hliníku z půdních minerálů a přechází do své toxické formy v podobě iontů  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{3+}$  and  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})^{3+}$  (Silva *et al.*, 2012).

Přesto, že je hliník hojně zastoupen v zemské kůře, nevyskytuje se v živých tkáních živočichů ani rostlin. V poslední době se ve zvýšené míře debatuje o spojitosti hliníku

s Alzheimerovou chorobou. Odborníci varují před nadměrným používáním antiperspirantů s hlinitými solemi, neboť se prý zvyšuje riziko vzniku tohoto vážného onemocnění.



**Obr. 3** - Zastoupení jednotlivých forem hliníku v roztoku v závislosti na pH (převzato a upraveno z Pierzynski et al. 2000).

V roce 2010 byl objeven transportér hlinitých iontů u rýže Nrati (Nramp aluminium transporter 1). Nrati se specializuje na transport pouze trivalentních iontů hliníku, bivalentní ionty manganu, železa či kadmia netransportuje. Nachází se na plazmatické membráně buněk kořenové špičky kromě epidermálních buněk. Nrati-knockout vykazuje snížený příjem  $Al^{3+}$ , zvýšené množství navázaného hliníku v buněčné stěně, zvýšenou senzitivitu vůči hlinitým iontům, ale neovlivňuje toleranci vůči dalším kovům (Xia et al., 2010).

## 2.5 Toxicita hliníku

Toxicita hlinitých iontů je hlavním faktorem limitujícím růst rostlin na kyselých půdách. Primárním projevem toxicity hliníku je rychlé zastavení kořenového růstu, ke kterému dochází v rámci několika minut (Krtková et al., 2012; Kopittke et al., 2015).

Velká pozornost je věnována nejcitlivější zóně kořene vůči působení hliníku. Dříve se vědci domnívali, že jí je kořenová čepička. Ovšem Ryan *et al.*, 1993 prokázali, že odstraněním kořenové čepičky není ovlivněná hliníkem indukovaná inhibice kořenového růstu. Později navrhli, že meristém je primárním cílem působení hlinitých iontů. Sivaguru a Horst, 1998 provedli experiment, při němž aplikovali hliník na 1 mm dlouhé segmenty kořene a zjistili, že k akumulaci hliníku dochází v distální tranzientní zóně, což vede k rychlé inhibici prodlužování kořene a tato zóna kořene byla prohlášena za nejcitlivější vůči hlinitým iontům. Přesto, že je fenomén rychlého zastavení růstu kořenů již dlouho studován, doposud není jasné, co je primárním cílem hlinitých iontů na buněčné úrovni.

Prvním potenciálním cílem je buněčná stěna (apoplast), konkrétně pektinová matrix nesoucí záporný náboj díky karboxylovým skupinám (Chang *et al.*, 1999). Krátkodobá akumulace hliníku se odvíjí od obsahu pektinů v buněčné stěně, na základě čehož může být vysvětlena odlišná akumulace hliníku u kukuřice a bobu obecného (Horst *et al.*, 1999). Dalším faktorem, který ovlivňuje vazbu hliníku na pektiny, je míra jejich metylace. Ta je kontrolována enzymy pektin methyltransferázou a pektin methylesterázou (PME). Krátkodobé ošetření kořenů kukuřice PME vedlo ke zvýšené akumulaci hliníku a inhibici dlouhivého růstu kořenů (Horst *et al.*, 2007).

Další z cílů hlinitých iontů může být plasmatická membrána, která je tvořena fosfolipidy a má záporný náboj.  $\text{Al}^{3+}$  disponuje 560x vyšší afinitou k fosfatidylcholinu než  $\text{Ca}^{2+}$ , které jsou tím pádem vytěsňovány a membrána je depolarizována (Ahn a Matsumoto, 2006). Kromě depolarizace membrány dochází také ke zvýšení její rigidity, což by vysvětlovalo inhibici růstu kořenů (Krtková *et al.*, 2012). Mění se propustnost membrány pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ , močovinu, vodu. Bylo zjištěno, že nemusí docházet k vazbě  $\text{Al}^{3+}$  pouze na fosfolipidy, např. u pšenice byla pozorována vazba hlinitých iontů na proteiny (Ahn a Matsumoto, 2006). Mechanismus, pomocí něž se rostlina může bránit vazbě  $\text{Al}^{3+}$  na lipidy, je produkce organických kyselin jako citrát a v menší míře malát.

Bylo prokázáno, že hliník může ovlivňovat také fosfolipidové signální dráhy. Ramos-Díaz *et al.* (2007) zjistili, že hlinité ionty inhibují aktivitu PLC, ale nepozměňují aktivitu PLD. Naopak Pejchar *et al.* (2008) pozorovali u BY-2 buněk po ošetření 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  pokles v produkci PA generované PLD. Hliník ovlivňuje také aktivitu fosfatidylcholin-hydrolyzující fosfolipázy C (PC-PLC), což se projevuje inhibicí růstu a

poklesem tvorby diacylglycerolu (DAG) u pylových láček tabáku. S rostoucí koncentrací  $\text{AlCl}_3$  se snižovala hladina DAG (Pejchar et al., 2010)

Za další z primárních cílů hliníkové toxicity je považována homeostáze  $\text{Ca}^{2+}$ . Zhang a Rengel (1999) naměřili nárůst koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu u 2 linií s odlišnou tolerancí vůči hliníku. U obou linií zaznamenali také inhibici kořenového růstu. V jiných experimentech byla po ošetření hliníkem pozorována zvýšená tvorba kalózy (Jones *et al.*, 2006). Pokud tedy hliník indukuje přechodný nárůst vápenatých iontů v cytosolu není překvapivé, že dochází k akumulaci kalózy, neboť vápenaté ionty jsou nezbytné pro spuštění její syntézy. Zvýšená tvorba kalózy je zřejmě mechanismus, kterým rostlina předchází průniku hliníku do apoplastu. Může inhibovat také transport symplastem a mezibuněčnou komunikaci tím, že "ucpává" plasmodesmy (Sivaguru *et al.*, 2000). Kromě tvorby kalózy způsobuje zvýšení cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  také dezorganizaci cytoskeletu (Rengel a Zhang, 2003).

Hliník způsobuje oxidativní stres a mění vlastnosti plazmatické membrány. Kromě depolarizace membrány, dochází také k její rigidifikaci a peroxidaci lipidů (Krtková *et al.*, 2012; Illéš *et al.*, 2006). Přesto, že doposud nebyl u *Arabidopsis* objeven transportér  $\text{Al}^{3+}$  a rychlost jeho transportu je velmi nízká (zřejmě endocytózou), vyskytuje se v nízkých koncentracích v cytoplazmě. Část je zneškodněna organickými kyselinami, část se může vázat například na GTP, ATP a ovlivňovat tak aktivitu aktinu a tubulinu. V jádře se váže na DNA, způsobuje kondenzaci chromatinu (Panda *et al.*, 2009). U tabákových buněk ošetřených hliníkem byla zaznamenána inhibice dýchání, vyčerpání ATP a v pozdějších fázích působení zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku, která může vést až k hliníkem indukované PCD (Huang *et al.*, 2014; Panda *et al.*, 2009).

### **2.5.1 Toxicita hliníku a její vliv na mikrotubuly**

Často bývá spojována hliníková toxicita s reorganizací, dezorganizací či stabilizací mikrotubulů. Reakce mikrotubulů se může lišit podle toho, na jaké pletiva hliník aplikujeme, jaké je jejich stáří, po jak dlouhou dobu je vystavujeme stresu, jakou koncentraci hliníkových iontů zvolíme.

Již před 30 lety Macdonald *et al.* (1987), ukázali, že hliník ovlivňuje polymeraci tubulinu *in vitro*.

Podle Schwarzerová *et al.* (2002) můžeme během prvních pár hodin ošetření hlinitými ionty pozorovat 2 hlavní změny ve struktuře cMTs BY-2-tabákových buněk. Za prvé se zvýšil počet svazku cMTs přibližně o čtvrtinu. Za druhé byly svazky tenčí. Po 6 hodinách byly kortikální mikrotubuly značně dezorganizovány a velmi tenké.

Sivaguru *et al.* (2003) vytvořili model, podle kterého hliník indukuje otevření výtokového kanálu pro glutamát, ten se váže na receptor, vápníkový kanál na plasmatické membráně. Zvýšená hladina cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  pak vede k depolymeraci mikrotubulů, depolarizaci membrány a inhibici elongačního růstu buňky.

Krtková *et al.* (2012) naopak pozorovali stabilizaci kortikálních mikrotubulů u laterálních buněk kořenové čepičky během prvních 30 minut ošetření 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  oproti nízkému pH, které způsobilo jejich nahodilé uspořádání (randomizaci).

Při růstové analýze *plda1* a *pldδ* rostlin bylo zjištěno, že *plda1* roste rychleji na médiu s hliníkem o koncentraci 100, 300  $\mu\text{M}$  než WT či *pldδ*. Rostliny mutantní v *PLDα* v raných fázích lépe odolávají působení stresu. 300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  vedla u WT přednostně k odumírání buněk, zatímco u *plda1* byly pozorovatelné buňky se změněným tvarem a docházelo u nich ve větší míře k reorganizaci cytoskeletu (DP Lucie Poláková, 2014).

Podle Pejchar *et al.* (2008) po aplikaci 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  dochází k inhibici aktivity  $\text{PIP}_2$ -dependentní PLD, což se projevuje poklesem produkce PA. Dále chtěli zjistit, zdali změny v dynamice mikrotubulů budou mít vliv na produkci PA v případě, že zároveň budou na buňky aplikovány i hlinité ionty. Zatímco taxol neměl žádný efekt na produkci PA, oryzalin výrazně zvyšoval produkci PA v přítomnosti  $\text{Al}^{3+}$ . Nelze jednoduše říci, že by destabilizace MTs vedla k aktivaci PLD. Signální dráha pravděpodobně zahrnuje další regulační mechanismus, který je citlivý vůči hliníku.

## 2.5.2 Mechanismus tolerance a rezistence rostlin vůči toxicitě hlinitých iontů

Některé rostliny jsou schopné tolerovat vysoké koncentrace hlinitých iontů, aniž by vykazovaly nějaké příznaky toxicity. Řadí se mezi ně rostliny schopné akumulovat kolem 1000 mg těžkého kovu na kilogram sušiny. Tato skupina rostlin zahrnuje přibližně 30 čeledí a mezi nejznámější zástupce patří čajovník, pohanka a hortenzie. Čajovník může akumulovat až 30 000 mg/kg sušiny ve starších listech, v mladých okolo 600 mg/kg sušiny. U hortenzie je to kolem 3000 mg/kg sušiny. *Melastoma malabathricum* a *Vaccinium macrocarpon*, které jsou zvyklé růst na půdách s nízkým pH akumulují velké množství hliníku jak v listech, tak kořenech (Shen a Ma, 2001).

Rostliny využívají 2 strategie, jimiž se brání Al stresu. Buďto tzv. vnitřní detoxifikací, kdy je hliník již přítomen v cytosolu. Rostlina využívá organických sloučenin k tvorbě komplexů s hlinitými ionty a transportuje je v metabolicky neaktivní formě do specifických rostlinných orgánů. V tomto případě mluvíme o toleranci rostlin vůči hliníku. Pro čajovník je typická chelatace hliníku sloučeninou katechinem. Druhou strategií je rezistence rostlin. Rostlina brání vstupu hliníku do symplastu a využívá k tomu organické kyseliny, které uvolňuje do rhizosféry. Opět dochází k chelataci a imobilizaci hlinitých iontů (Brunner a Sperisen, 2013).



## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Rostlinný materiál

Při experimentech byly použity jako WT rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia a rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia mutantní v genu pro PLD $\alpha$ 1 (SALK\_053785) a PLD $\delta$  (SALK\_023247). Pro sledování dynamiky mikrotubulů byla využita AtEB1a-GFP exprimující linie (Chan *et al.*, 2003), která byla nakřížena jak do WT rostlin, tak do rostlin mutantních v PLD $\alpha$ 1 a PLD $\delta$ .

Při studiu akumulace hliníku v kroužku Ortmannové bylo pracováno s *exo70H4-1* mutantem (SALK\_023593) a kontrolou byly WT rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia. Semena byla poskytnuta doktorem Ivanem Kulichem.

### 3.2 Metody

#### 3.2.1 Elektroporace vektoru EB1-GFP do *Agrobacterium tumefaciens*

Kompetentní buňky *A. tumefaciens* byly rozmrazeny na ledu. K 40  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk byly přidány 2  $\mu$ l vektoru EB1-GFP (binární vektor pK7WGF2 kódující GFP-EB1, laboratoř prof. P. Nicka, KIT) a jednu minutu inkubovány na ledu. Poté byly buňky přepipetovány do zchlazené kyvety, která byla vložena do elektroporátoru. Byl aplikován puls o napětí 2 kV. Po pulsu byl k buňkám přidán 1 ml YEB média (meat extract=5 g/l, yeast extract=1 g/l, pepton=5 g/l, sacharóza=5 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O=0.5 g/l) a celý obsah kyvety byl přepipetován do zkumavky. Buňky byly ponechány 2 hodiny na třepačce při teplotě 28°C. 20  $\mu$ l suspenze bylo vyseto na plotnu s pevným YEB (stejně složení + agar 17 g/l) a antibiotiky (na 20 ml YEB přidáno 20  $\mu$ l spectinomycinu o konc. 50 mg/ml, 100  $\mu$ l rifampicinu o konc. 10 mg/ml). Kultivováno přes noc při teplotě 28°C. Druhý den vybrána jedna kolonie, která byla rozetřena o stěnu malé Erlenmeyerovy baňky s 20 ml tekutého YEB s antibiotiky (stejně množství jako v předešlém případě). Přes noc ponecháno na třepačce při 28°C. Třetí den bylo do 300 ml YEB napipetováno 300  $\mu$ l

spectinomycinu (50 mg/ml) a 600 µl bakteriální suspenze. Přes noc ponecháno na třepačce při 28°C. Čtvrtý den byla provedena transformace rostlin.

### **3.2.2 Transformace rostlin metodou floral-dip**

Bakteriální suspenze byla 15 minut centrifugována při 3700 g, teplotě 4°C. Supernatant byl vylit, sediment rozmíchán ve zbylé kapalině a poté v malém množství 5 % sacharózy. Poté byl obsah kyvety přelit do odměrného válce a dolit 5 % sacharózou.

Byl přidán Silwett L-77 do konečné koncentrace 0.05 %. Z rostlin (cca 6-týdenní) byly odštíhnuty všechny šešule a otevřené květy. Jedna po druhé byly na dobu cca 5-10 s ponořeny do suspenze. Poté byla každá rostlinka zabalena do potravinové fólie a ponechána přes noc ve tmě. Následující den byly rostliny vyndány z igelitu a přemístěny do kultivační místnosti. Rostliny byly pěstovány v Arasystémech, aby nedošlo ke zbytečné ztrátě semen.

Poté, co rostliny vytvořily šešule, byla semena nejprve skladována v papírových sáčcích, ve kterých se sušily cca 3 dny, a následovně byla přendána a skladována ve zkumavkách.

### **3.2.3 Selektce rostlin s GFP-markerem**

Před vysetím byla semena vysterilizována. Nejprve byla promyta 96 % etanolem (max. 1 minutu), poté 10 minut v 50 % roztoku Sava a nakonec 4x promyta destilovanou vodou. Po dobu dalších 3 dnů byla semena ponechána v lednici.

Semena byla vyseta na minimálním MS médiu (sacharóza=10 g/l, MS soli=2.2 g/l, agar=12 g/l, pH=5.7). Petriho misky se semeny byly přeneseny do kultivační místnosti a kultivovány po dobu 4 dnů. Pomocí fluorescenční lupy měly být pak vybrány semenáčky vykazující fluorescenci v GFP. Bohužel toto kritérium žádný ze semenáčků nesplňoval a transformace byla ještě jednou zopakována.

### **3.2.4 Tranzientní transformace**

Kromě transformace metodou floral-dip byla vyzkoušena také tranzientní transformace podle Jing-Feng Li *et al.*, (2009) pro kontrolu funkčnosti plazmidu. Jako kontrola byl použit peroxisomální marker GFP-PTS1 (Nelson *et al.*, 2007).

První a druhý den se postupovalo stejně jako 1. a 2. den při elektroporace vektoru EB1-GFP a PTS1-GFP do *Agrobacterium tumefaciens*. Třetí den byly do 100 ml Erlenmeyerovy baňky s 25 ml tekutého YEB média napipetovány 3 ml bakteriální suspenze, byla změřena optická denzita při 600 nm (EB1=0.427, PTS1=0.390) a suspenze byla ponechána po dobu cca 7 hodin na třepačce při teplotě 28°C dokud OD<sub>600</sub> nepřesáhla hodnotu 1,5. Poté byla suspenze přelita do falkony o objemu 50 ml a zcentrifugována 10 min na 3000 g při pokojové teplotě. Během centrifugace byl připravován kokultivační roztok (1/4 MS médium, acetosyringon 1:1000 (20 µM), silwett 25 µl/l). Supernatant byl vylit a pelet byl resuspendován v 10 ml promývacího roztoku (10 mM MgCl<sub>2</sub>). Suspenze byla opět zcentrifugována za stejných podmínek, supernatant vylit a pelet resuspendován v 2 ml promývacího roztoku.

Následně byla změřena OD<sub>600</sub> (EB1=1.460, PTS1=1.332). Po 1 ml byl kokultivační roztok napipetován do 12 jamkové destičky. Do každé jamky bylo umístěno cca 10ks semenáčků *Arabidopsis* (4-denní). Byl připraven gradient hustot (OD<sub>600</sub>=0,4; 0,6; 0,8), podle kterého bylo do každé jamky přidáno odpovídající množství bakteriální suspenze. Destička byla zabalena do alobalu a po dobu dvou dnů ponechána na třepačce při pokojové teplotě. Šestý den byl z jamek odpipetován kokultivační roztok a semenáčky byly 3x promyty minimálním MS médiem s přídavkem Claforanu. Nakonec bylo přidáno pouze čisté MS médium a destička byla ponechána další dva dny na třepačce. Osmý den pozorování pod konfokálním mikroskopem Leica TCS.

U kontrolních rostlin s peroxisomálním markerem GFP-PTS1 se transientní transformace podařila a vykazovaly fluorescenci v GFP, na rozdíl od EB1-GFP markeru, který se opět nepodařilo do rostlin netransformovat.

### 3.2.5 Křížení rostlin

Rostliny WT, mutantní rostliny v PLD $\alpha$ 1, PLD $\delta$  a EB1a-GFP exprimující linie byly vysety na rašelinové pelety a nesterilně pěstovány při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C.

Jakmile rostliny začaly tvořit květy, byly zkříženy. Křížení bylo provedeno v obou směrech. Semena ze zralých šesulí (F1 generace) byla sklizena do papírových sáčků, po dobu 2 dnů ponechána v otevřených zkumavkách a poté opět vyseta na rašelinové pelety. Vzniklá F2 generace semen byla nejprve vysterilizována (viz. kapitola 2.2.3. Selektce

rostlin s GFP-markerem) a 4 dny stratifikována v lednici. Poté byla vyseta na minimální MS médium. Po 5 dnech byly pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus Provis AX 70 vybrány rostliny vykazující fluorescenci GFP. Tyto rostliny byly přesazeny na rašelinové pelety a kultivovány v kultivační místnosti při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C. Přibližně 14-denní rostliny pak byly genotypovány.

### **3.2.6 Genotypování**

#### **A. Izolace DNA pro PCR**

Rostlinám rostoucím 12 dní na rašelinových peletách byl uštěřen list, který byl vložen do epinky s cca 6 skleněnými kuličkami. Epinky byly ihned vhazovány do tekutého dusíku. Poté byly vzorky homogenizovány v homogenizátoru po dobu 3 minut při frekvenci kmitu 25. Ihned po homogenizaci bylo ke vzorkům napipetováno 400 µl extrakčního pufru (200 mM Tris-HCl pH=7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS). Vzorky byly 1 minutu centrifugovány při maximálních otáčkách. 300 µl supernatantu bylo přepipetováno do nových epinek a doplněno 300 µl isopropanolu. Následovaly 2 minuty stání a centrifugace 5 minut při maximálních otáčkách. Supernatant byl vylit a zkumavky se nechaly plně vyschnout (cca 20 minut). Nakonec byla DNA resuspendována v 50 µl vody a vzorky byly přes noc ponechány v mrazáku.

#### **B. Amplifikace DNA metodou PCR**

Vzorky jsem si nechala rozmrazit na ledu. Během toho jsem si připravila reakční směs, která obsahovala:

171 µl H<sub>2</sub>O

20 µl pufru pro DreamTaq polymerázu

2,5 µl DTP (10 mM)

2 µl od každého primeru (0.1 mM)

0,5 µl DreamTaq polymerázy (přidává se nakonec, nestabilní)

Směs rozpipetována po 19,6  $\mu$ l do připravených epinek. Nakonec do každé epinky 1  $\mu$ l DNA.

Poté byl použit PCR cycler MJ Research PTC-200.

Program PCR reakce:

- 1) 2 min při 94°C
- 2) 30 s při 94°C, 1 min při 58°C, 1min při 72°C; 26 cyklů
- 3) 10 min při 72°C
- 4) chlazení na 4°C

### **C. Elektroforéza**

Smícháním 300 ml 0,5xTAE pufru (2,42 g Tris base; 5,71 ml ledové kyseliny octové; 1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; voda do 1 l) a 3,6 g agarózy byl připraven 1,2 % gel. Po zchlazení pod tekoucí vodou bylo přidáno 30  $\mu$ l GelRedu. Vše bylo promícháno a nalito do formy sloužící k přípravě gelů. Gel byl přendán do elektroforetické vany a přelit 0,5xTAE puftrem. Vzorky DNA smíchané s nanášecím puftrem (v poměru 10:2) byly napipetovány do jednotlivých jamek. Jako poslední byl nanesen marker GeneRuler 100 bp. Elektroforéza byla zakryta víkem a připojena ke zdroji napětí (nastaveno na 102 mA). Po cca 35 minutách byl gel vyjmut a naskenován.

#### **3.2.7 Hydroponická kultivace rostlin**

K hydroponické kultivaci byly využity skleněné barvící vaničky. Do každé z nich byly umístěny speciálně upravená sklíčka. Každé sklíčko bylo tvořeno podložním a krycím sklem, které byly k sobě připevněny pomocí nitě. Krycí sklo tak vytvořilo „drážku“, podél které bylo možné napipetovat minimální MS médium (sacharóza=10 g/l, MS soli=2.2 g/l, agar=12 g/l, pH=5.7). Na tuto tenkou vrstvičku média pak byly pomocí pipety nasety semena. Do vaničky se sklíčky bylo nalito přibližně 100 ml kultivačního média. Nakonec byla vanička zajištěna parafilmem, aby nedocházelo ke kontaminaci.



*Obr. 4 – Ukázka z hydroponické kultivace rostlin za využití skleněných barvicích vaniček.*

### **3.2.8 Růstová analýza kořenů**

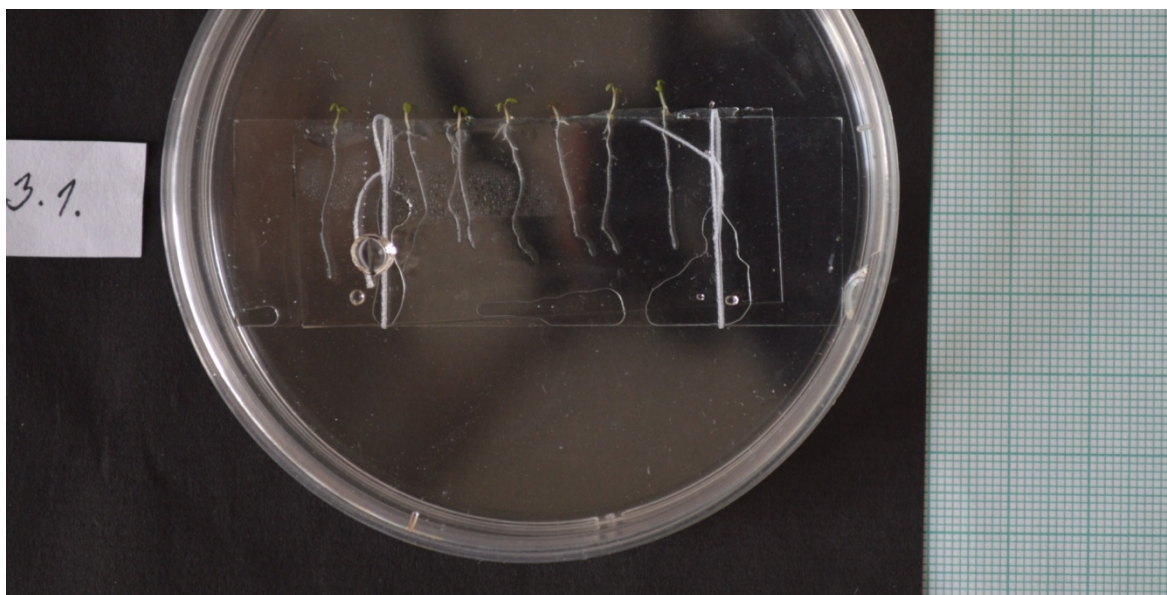
Pro růstovou analýzu kořenů byly použity WT rostliny a rostliny s mutací v *PLD $\alpha$ 1*. Rostliny byly pěstovány v hydroponickém systému popsáném výše. Na každé sklíčko bylo vyseto přibližně 10 semen, které byly předtím vysterilizovány a stratifikovány 3 dny v lednici. Po dobu 4 dnů byly rostliny kultivovány v 1/8 MS médiu. Čtvrtý den byla sklíčka s rostlinami vyfocena pomocí fotoaparátu Nikon D3200 a přemístěna do skleničků obsahujících médium bez či s danou koncentrací hliníku (viz Seznam použitých médií níže). Osmý den byla opět sklíčka nafocena. Focení probíhalo vždy ve sterilní Petriho misce, jako měřítko byl využit milimetrový papír.

Média použitá při hydroponické kultivaci:

- 1/8 MS, pH=5.7
- 1/8 MS, pH=4.5
- 1/8 MS, pH=4.5 + 100, 200 či 300  $\mu$ M  $\text{AlCl}_3$

Úprava pH médií probíhala před jejich sterilizací autoklávováním. pH médií s hliníkem bylo upravováno semisterilně po přidání hliníku do média.

Délka kořenů byla měřena v programu Fiji a to vždy od hypokotylu po kořenovou špičku. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel do sloupcových grafů. Výsledky byly ověřovány pomocí t-testu. Experiment byl 3x opakován a v každé variantě bylo vyhodnocováno kolem 20-30 rostlin.



**Obr. 5** – Měření délky kořenů *A. thaliana* probíhalo vždy ve sterilní Petriho misce.

### 3.2.9 Sledování dynamiky kortikálních mikrotubulů

Rostliny *A. thaliana* WT a *plda1* exprimující EB1a-GFP marker byly pěstovány 4 dny na minimálním MS médiu při světelných podmínkách 16/8 a teplotě 21°C. Poté byly rostliny pozorovány na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880, objektivem 63x s vodní imerzí a numerickou aperturou 1,2. Při pozorování byla použita stejná média jako v případě hydroponické kultivace. Perfúze pod sklíčkem (promývání kořene přímo na sklíčku) nebylo možné, protože kořen v médiu plaval a "unikal" tak ze záběru. Na 1 buňku bylo vyhodnocováno 10-15 +konců mikrotubulů, což bylo dáno tím, že byla vždy pozorovatelná jen část kortikální cytoplazmy dané buňky. Buňky byly snímány každé 2 s po dobu 40 s. Z výsledných videí pak byla pomocí programu Fiji (plugin manual tracking) změřena délka trajektorie jednotlivých +konců mikrotubulů a v programu Excel pak byla vypočítána rychlost polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů v jednotkách nm/min.

Nejprve jsem si dala za úkol porovnat rychlost polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů v transientní a elongační zóně kořene za normálních podmínek (pH=5.7), za sníženého pH (pH=4.5) a po přidání hliníku (pH=4.5 + 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>). Experiment byl 3x opakován a pro každou variantu bylo hodnoceno 15 buněk (15 rostlin). Na jednu rostlinu byla vždy vyhodnocována 1 buňka z transientní a 1 buňka z elongační zóny při daných podmínkách.

Dále jsem se zaměřila jen na transientní zónu kořene, neboť ta se jeví jako nejcitlivější vůči toxicitě hliníku. Za prvé jsem chtěla zjistit, zdali dochází ke změnám orientace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů v čase 10, 20 a 30 minut za normálních podmínek (pH=5.7), za sníženého pH (pH=4.5) a po přidání hliníku (pH=4.5 + 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>) a za druhé zdali se mění rychlost polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů v čase. Experiment byl více jak 10x opakován, neboť snímání je časově náročné a při každém experimentu bylo hodnoceno kolem 3-5 buněk pro každou variantu.

Kromě rychlosti polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů a orientace mikrotubulů, byla hodnocena také změna počtu +konců mikrotubulů v čase.

### **3.2.10 Zjišťování přítomnosti hliníku v trichomech pomocí Morinu**

Rostliny *A. thaliana* *exo70H4-1* a WT ekotyp Columbia (kontrola) byly pěstovány v hydroponickém systému (viz. kapitola 2.2.9) po dobu 3 týdnů. Před samotným vyšetím byla semena vysterilizována a stratifikována po dobu 3 dnů v lednici. Pro kultivaci bylo zvoleno 1/8 MS médium o pH=5.7. Po 3 týdnech byla polovina sklíček s rostlinami sterilně přemístěna do skleničků s hliníkovým médiem (1/8 MS + 300  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>), kde byla ponechána dalších 7 dní. Pro značení Morinem byly listy promývány 3 hodiny v roztoku kyseliny octové s etanolem (1:3), poté byly 3x promyty v deionizované vodě. Nakonec byl přidán zásobní roztok Morinu (0.1 M v DMSO) a to v koncentraci 2x vyšší než byla předpokládaná (240  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>) koncentrace hliníku v médiu.

Listy s trichomy pak byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse 90i objektivem se zvětšením 20x.



### 3.2.11 Izolace protoplastů

Rostliny *A. thaliana* WT exprimující EB1a-GFP marker a GFP-TUA6 linie byly pěstovány 14-21 dnů na minimálním MS médiu při světelných podmínkách 16/8 a teplotě 21°C. Před vysetím byly semena vysterilizovány a stratifikovány v lednici cca 3 dny.

Zásobní enzymový roztok (pH=5.8) byl smíchán s enzymy (celuláza, macerozym, pektolyáza, viz Tab. 1). Při prvním pokusu byly nařezány nadzemní i kořenová část rostlin (při dalších experimentech se pracovalo pouze s kořeny) a přemístěny do roztoku s enzymy. Destička s jamkami byla zabalena do alobalu a ponechána při pokojové teplotě bez třepání. Po cca 4,5 h byl k suspenzi přidán roztok W5 (viz Tab. 2, stejné množství jako enzymového roztoku na začátku experimentu). Suspenzi jsem přefiltrovala pomocí nylonového sítky (s póry o velikosti 46 a 86  $\mu\text{m}$ ). Filtrát byl přelit do falkony a zcentrifugován při 100g na 2 minuty. Část supernatantu byla odpipetována, dolit opět W5 roztok a znovu zcentrifugováno. Nakonec jsem odpipetovala téměř všechny supernatant a přidala 1 ml regeneračního média Km8P (viz Tab. 3; Kao a Michayluk, 1975) s mannitem. Protoplasty byly kultivovány přes noc v destičce s jamkami, která byla zajištěna parafilmem, aby nedocházelo ke kontaminaci.

Protoplasty byly druhý den pozorovány na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880, objektivem 63x s vodní imerzí a numerickou aperturou 1,2.

Enzymový roztok	
MES	20 mM
KCl	20 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Celuláza	1%
Pektoliáza	1%
Macerozym R10	0.4%
Mannitol	0.45 M

**Tab. 1** – Složení enzymového roztoku pro izolaci protoplastů.

Roztok W5	
MES	2 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	125 mM
NaCl	154 mM
Mannitol	0.45 M

**Tab. 2** – Složení roztoku W5.

<b>Médium Km8P</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	600 mg/l
KNO <sub>3</sub>	1900 mg/l
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	600 mg/l
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	300 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
KCl	300 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	28 mg/l
KI	0,75 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	10 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
Sacharosa	0,25 g/l
Glukosa	34,2 g/l
Pyruvát sodný	20 mg/l
Kyselina citronová	40 mg/l
Kyselina jablečná	40 mg/l
Kyselina fumarová	40 mg/l
Fruktosa	250 mg/l
Ribosa	250 mg/l
Xylosa	250 mg/l
Mannosa	250 mg/l
Rhamnosa	250 mg/l
Cellobiosa	250 mg/l
Sorbitol	250 mg/l
Mannitol	250 mg/l
D-Myo Inositol	100 mg/l
Nikotinamid	1,0 mg/l
PyridoxinHCl	1,0 mg/l
ThiaminHCl	1,0 mg/l
D-Calciumpantotenát	1,0 mg/l
Kyselina listová	0,4 mg/l
Aminobenzoová kyselina	0,02 mg/l
Biotin	0,01 mg/l
Choline chlorid	1,0 mg/l
Riboflavin	0,2 mg/l
Kyselina askorbová	2,0 mg/l

Vitamin A	0,01 mg/l
Vitamin D3	0,01 mg/l
Vitamin B12	0,02 mg/l
Kasein	250 mg
Kokosová voda	20 ml
2,4-D	0,2 mg/l
Zeatin	0,5 mg/l
NAA	1,0 mg/l

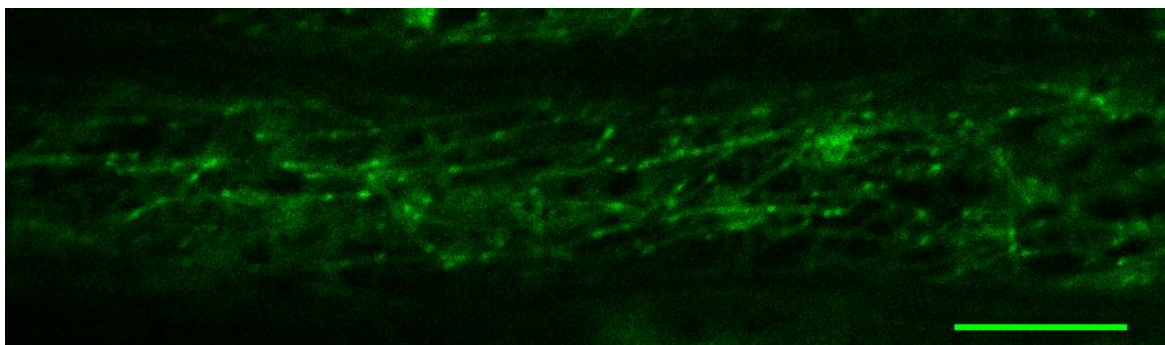
**Tab. 3** – Složení Km8P média pro regeneraci protoplastů.

## 4 VÝSLEDKY

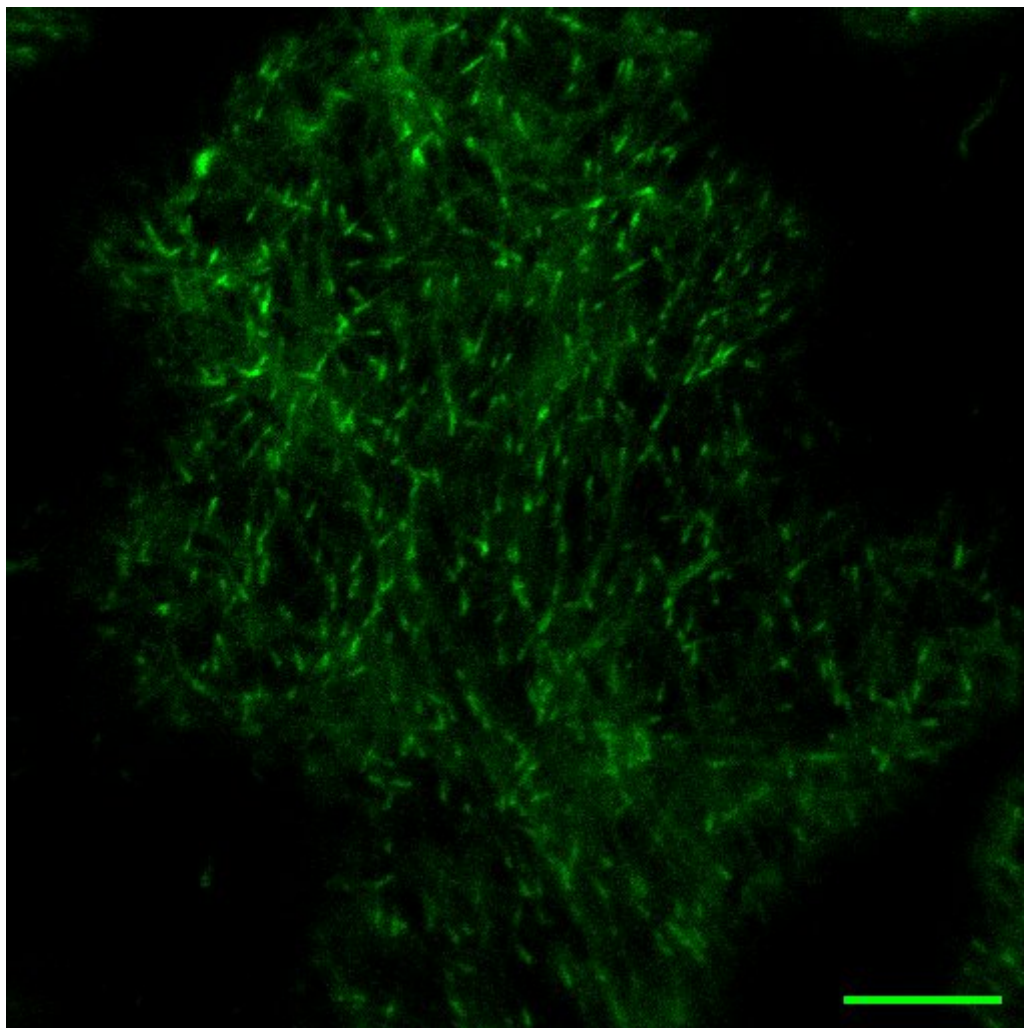
### 4.1 Marker EB1-GFP v rostlinách *Arabidopsis*

Za účelem sledování dynamiky kortikálních mikrotubulů jsem se rozhodla využít EB1 protein jako marker plus konců mikrotubulů. Měla jsem k dispozici vektor EB1-GFP od prof. Petera Nicka (Karlsruhe Institute of Technology), kterým jsem nejprve transformovala *A. tumefaciens* pro následnou transformaci rostlin metodou floral-dip. Opakovaně se mi nedařilo získat žádné selektanty, proto jsem se rozhodla testovat vektor metodou transientní transformace semenáčků *Arabidopsis*. Ani tato metoda nevedla k expresi vektoru EB1-GFP v buňkách a dále už s ním nebylo pracováno. Byla získána linie *Arabidopsis thaliana* exprimující AtEB1a-GFP (Chan *et al.*, 2003), která byla nakřížena do WT a *pldα1* rostlin. Z F2 generace semen byly vyselektovány rostliny vykazující fluorescenci GFP. Pomocí genotypování byly identifikovány homozygotní rostliny.

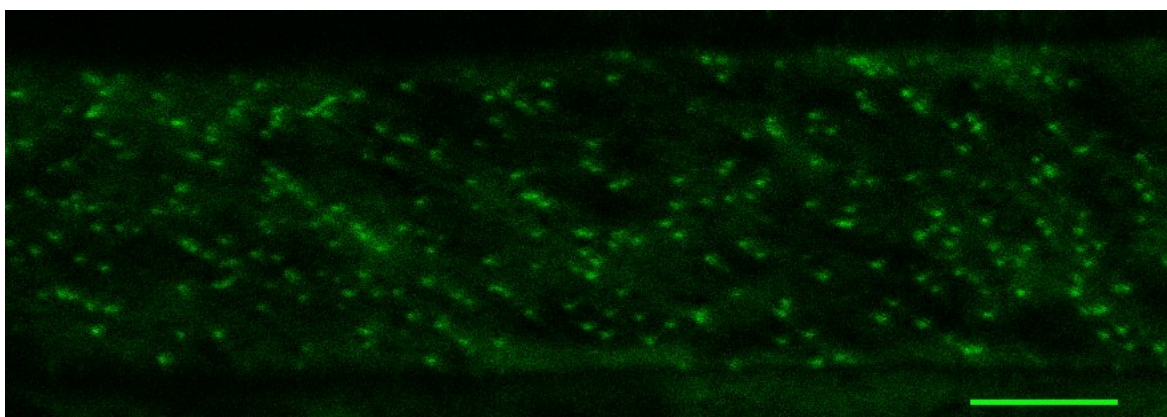
EB1a-GFP byl velmi dobře exprimován u WT rostlin a rostlin mutantních v PLD $\alpha$ 1. *pldδ* vykazovaly velmi slabou fluorescenci a z časových důvodů s nimi již nebylo pracováno, neboť by pro získání stabilně svítící populace musely být přepěstovány. Během interfáze EB1a-GFP značí plus konce mikrotubulů a vytváří typické komety. Marker je vhodný pro pozorování mikrotubulů v buňkách pokožky (viz obr. 7), hypokotylu (viz obr. 6) a kořene (viz obr. 8). Vzhledem k zaměření DP jsem se dále věnovala kořenovým buňkám.



**Obr. 6** – EB1a-GFP marker značící plus konce mikrotubulů v buňce hypokotylu při pH=5.7, měřítko 10  $\mu$ m.



**Obr. 7** – EB1a-GFP marker značící plus konce mikrotubulů v buňce pokožky při pH=5.7. měřítko 10  $\mu$ m.



**Obr. 8** – EB1a-GFP marker značící plus konce mikrotubulů v buňce elongační zóny kořene při pH=5.7, měřítko 10  $\mu$ m.

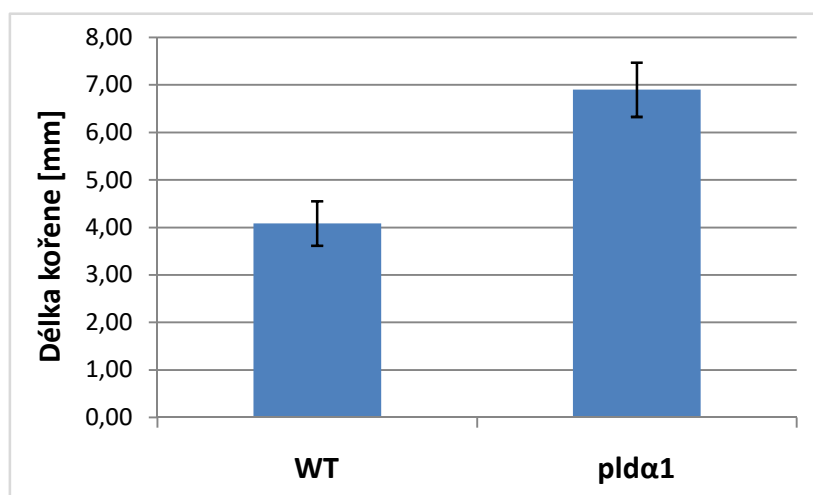
## 4.2 Růstová analýza kořenů

V první řadě byla provedena růstová analýza kořenů. Chtěla jsem ověřit, zdali má hliník odlišný vliv na růst kořenů rostlin *A. thaliana* WT a *plda1*. Rostliny byly pěstovány v hydroponii v 1/8 MS médiu o pH=5,7. Po 4 dnech byly vyfoceny a přemístěny do skleničků s kontrolními podmínkami (pH=5,7 a pH=4,5) a s danými koncentracemi hliníku (100, 200 a 300  $\mu$ M). Po 4 dnech (tedy 8-denní rostliny) byly opět vyfoceny. Po skončení experimentu byly změřeny pomocí programu Fiji délky kořenů ze 4. a 8. dne experimentu. Jako měřítko byl použit milimetrový papír.

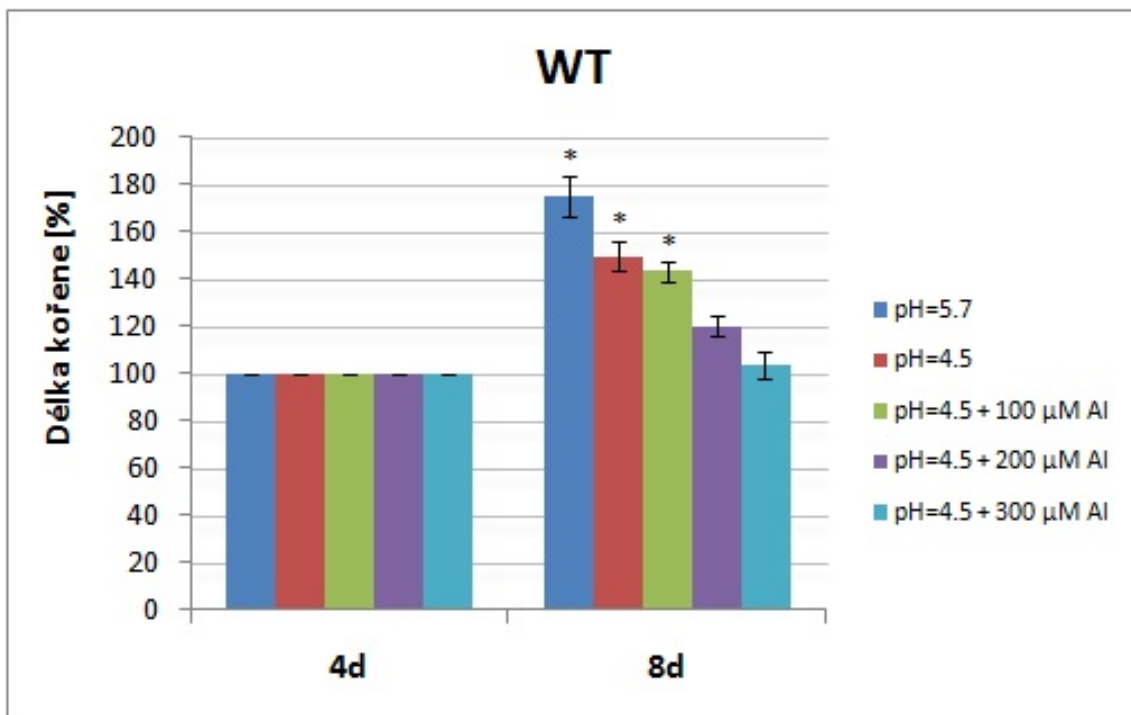
U WT rostlin můžeme pozorovat, že zvyšující se koncentrace hliníku má za následek zvyšující se inhibici růstu kořenů (Graf č. 2). 300  $\mu$ M koncentrace hliníku vede k úplné inhibici růstu kořene (za 4 dny nárůst o pouhých 5%).

U *plda1* byly naměřeny celkově vyšší přírůstky v délce kořenů než u WT (Graf č. 1) již po 4 dnech v kontrolním médiu. Délka kořenů při 100  $\mu$ M koncentraci byla srovnatelná s délkou kořenů rostoucích při pH=5,7. 300  $\mu$ M koncentrace neměla tak inhibiční vliv na růst kořenů jako v případě WT rostlin, za 4 dny kořeny narostly o přibližně 40% (Graf č. 3).

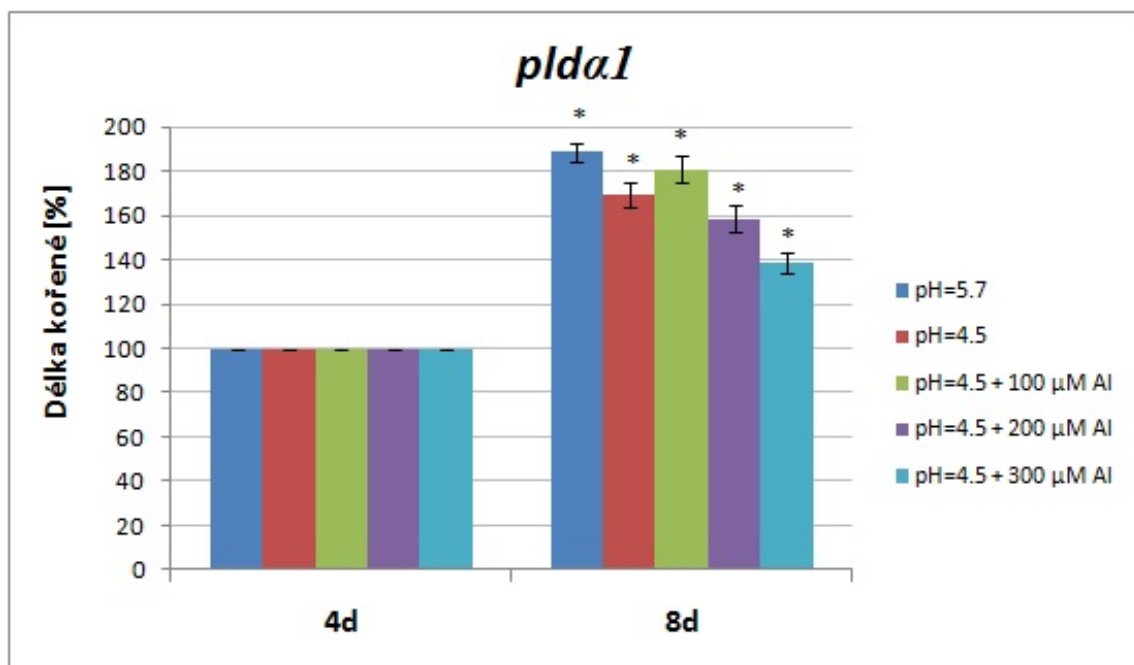
Zatímco u WT pozorujeme výraznější inhibici růstu kořenů, *plda1* buňky se lépe vyrovnávají s toxicitou hlinitých iontů.



**Graf č. 1** – Zprůměrovaná délka kořenů 4-denních rostlin WT a *plda1* naměřená při pH=5,7, pH=4,5, pH=4,5 + 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>, pH=4,5 + 200  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>, pH=4,5 + 300  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>. Chybové úsečky představují standartní chybu.



**Graf č. 2** – Vliv sníženého pH a zvyšující se koncentrace hlinitých iontů na růst kořenů u 4-denních WT rostlin. Chybové úsečky představují standartní chybu.



**Graf č. 3** – Vliv sníženého pH a zvyšující se koncentrace hlinitých iontů na růst kořenů u 4-denních *plda1* rostlin. Chybové úsečky představují standartní chybu.

### 4.3 Vliv hlinitých iontů na dynamiku kortikálních mikrotubulů elongační a transientní zóny kořene

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zdali bude odlišná reakce kortikálních mikrotubulů na toxické působení hliníku v elongační a transientní zóně kořene projevující se zrychlením či zpomalením polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů. Využity byly 4-denní rostliny *A. thaliana* WT s GFP markerem pro EB1a, které byly pěstovány na minimálním MS médiu v Petriho miskách. Při mikroskopování byly použity 2 kontroly (1/8 MS médium o pH=5,7 a pH=4,5) a pro studium vlivu hlinitých iontů na dynamiku cMTs bylo použito 1/8 MS médium s hlinitými ionty o koncentraci 100  $\mu$ M. Rostliny byly pozorovány bezprostředně po vložení do média v čase přibližně 3min.

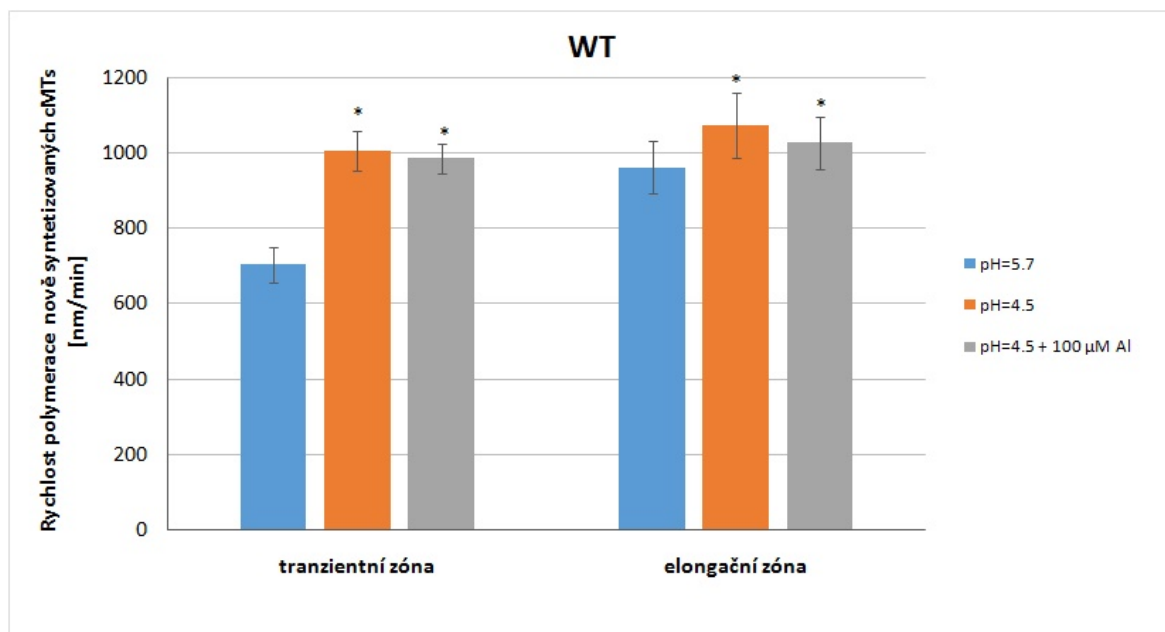
Kortikální mikrotubuly transientní zóny kořene vykazují mnohem nižší rychlost polymerace při pH=5,7 oproti elongační zóně (viz Tab. 4). Jak snížení pH, tak přidání 100  $\mu$ M koncentrace AlCl<sub>3</sub> vedlo k okamžitému nárůstu rychlosti polymerace v elongační i transientní zóně (viz Graf. 4). U transientní zóny byl nárůst rychlosti polymerace v obou případech vyšší. Po ošetření médiem s nižším pH došlo k nárůstu o 47%, v případě 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> byl nárůst 43%. V elongační zóně byl naměřen nárůst 12% při pH=4,5 a 7% při použití média s hlinitými ionty.

Vzhledem k tomu, že u rostlin ošetřených nízkým pH nebo hlinitými ionty byly vždy po 3 minutách působení naměřeny vyšší rychlosti polymerace cMTs, usuzují, že rychlost polymerace mikrotubulů reaguje okamžitě na změnu pH. V elongační zóně reagují mikrotubuly méně citlivě na snížení pH a působení hlinitých iontů než v zóně transientní. V první fázi působení nízkého pH a hlinitých iontů tedy reagují kortikální mikrotubuly jak transientní, tak elongační zóny spíše na změnu pH než 100  $\mu$ M koncentraci hlinitých iontů.

	<b>Tranzientní zóna</b> [nm]	<b>Elongační zóna</b> [nm]
<b>pH=5.7</b>	704±47	962±69
<b>pH=4.5</b>	1005±54	1072±87
<b>pH=4.5 + 100 <math>\mu</math>M Al</b>	985±40	1027±70

**Tab. 4** – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs v tranzientní a elongační zóně WT rostlin s EB1a-GFP markerem v čase 3 minuty po ošetření daným médiem. Uvedené hodnoty jsou průměrné rychlosti polymerace  $\pm$  SD.





**Graf č. 4** – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMT v elongační a transientní zóně kořene bezprostředně po aplikaci sníženého pH a 100 μM koncentrace hlinitých iontů u 4-denních WT rostlin s EB1a-GFP markerkem.

#### 4.4 Pozorování dynamiky kortikálních mikrotubulů v čase

Na základě předešlých výsledků jsem se rozhodla dále pracovat pouze s mikrotubuly transientní zóny kořene a zjistit, zdali se bude lišit rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs po delší době ošetření nízkým pH a různou koncentrací hlinitých iontů. Pokusy byly prováděny na 4-denních rostlinách *A. thaliana* WT a *plda1* s GFP markerem pro EB1a rostoucích v Petriho miskách na minimálním MS médiu. Při mikroskopování byly použity 2 kontroly (1/8 MS médium o pH=5,7 a pH=4,5) a pro studium vlivu hlinitých iontů na dynamiku cMTs bylo použito 1/8 MS médium s hlinitými ionty o koncentraci 100 a 300 μM. Rostliny byly pozorovány po vložení do média v čase 3, 10, 20 a 30 minut.

Z grafu č. 5 a 6 můžeme vidět, že u WT i *plda1* rostlin dochází k přibližně stejnému statisticky průkaznému nárůstu rychlosti polymerace okamžitě po ošetření nízkým pH a nižší, vyšší koncentrací AlCl<sub>3</sub>. V dalších grafech je rychlost polymerace nově syntetizovaných mikrotubulů uváděna v procentech. Důvodem je technické provedení experimentu. Rostliny byly vloženy do daného média a okamžitě pozorovány, přičemž nejkratší možný čas pozorování byl 3 minuty. Perfúze přímo na sklíčku nebyla možná,

kořeny plavaly v médiu. Každá rostlina byla pozorována tedy v čase 3, 10 a 30 minut a údaj pro čas 0 min nebyl k dispozici.

U WT po 10 minutách vzrostla rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs jak při sníženém pH, tak po přidání hlinitých iontů (viz Tab. 5, Graf č. 7). 100 $\mu$ M koncentrace hliníku měla stejný vliv na rychlost polymerace jako pH=4.5. Výraznější nárůst rychlosti polymerace byl zaznamenán až po přidání 300  $\mu$ M koncentrace AlCl<sub>3</sub>. Po 30 minutách je situace úplně stejná. pH=4,5 a 100  $\mu$ M koncentrace hliníku vedla k přibližně stejnému nárůstu rychlosti polymerace. Až koncentrace 300  $\mu$ M vedla k průkaznějšímu nárůstu rychlosti polymerace.

U *plda1* je tomu jinak. Po 10 minutách došlo k průkaznému poklesu rychlosti polymerace po přidání 100  $\mu$ M koncentrace hliníku a naopak koncentrace 300  $\mu$ M zrychlovala polymeraci mikrotubulů stejně jako snížené pH (viz Tab. 6, Graf č. 8). 30 minut vedlo k dalšímu poklesu rychlosti polymerace cMTs při ošetření 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>. Snížení pH vedlo k mírnému nárůstu rychlosti polymerace nově syntetizovaných cMTs. Vyšší koncentrace hlinitých iontů v roztoku měla za následek prudké zvýšení rychlosti polymerace cMTs.

Podle dosažených výsledků lze říci, že WT buňky se po 30 minutách ošetření 100  $\mu$ M hliníkem vyrovnávají spíše s nižším pH než hlinitými ionty a až 300  $\mu$ M koncentrace hliníku zvyšují rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs. *plda1* buňky reagují již na nižší koncentraci hlinitých iontů v roztoku poklesem rychlosti polymerace cMTs. 300  $\mu$ M koncentrace hliníku vede k průkaznému nárůstu rychlosti polymerace až po 30 minutách ošetření.

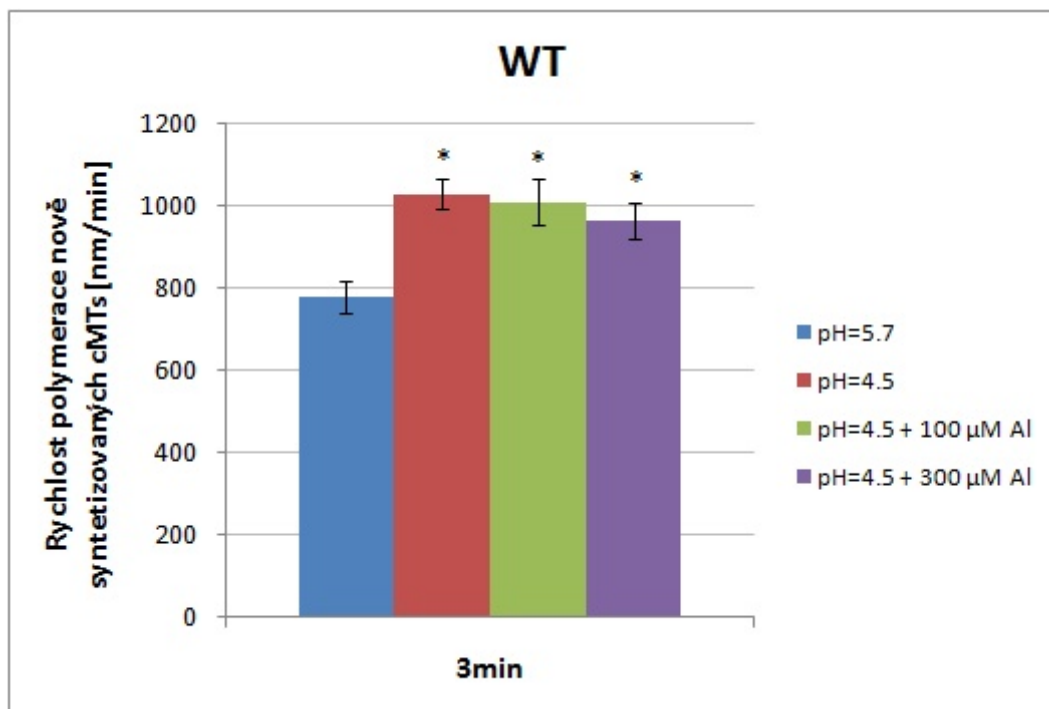
Buňky postrádající *plda1* jsou citlivější již vůči nižším koncentracím hliníku, na které reagují zpomalením rychlosti polymerace. Vyšší koncentrace hliníku u nich vede ke zrychlení polymerace až po delší době působení hlinitých iontů.

<b>WT</b>	<b>3 min [nm]</b>	<b>10 min [nm]</b>	<b>30 min [nm]</b>
<b>pH=5.7</b>	779±40	778±50	783±30
<b>pH=4.5</b>	1031±37	1048±36	1096±43
<b>pH=4.5 + 100 µM Al</b>	1011±57	1041±35	1096±59
<b>pH=4.5 + 300 µM Al</b>	1067±45	1144±54	1227±38

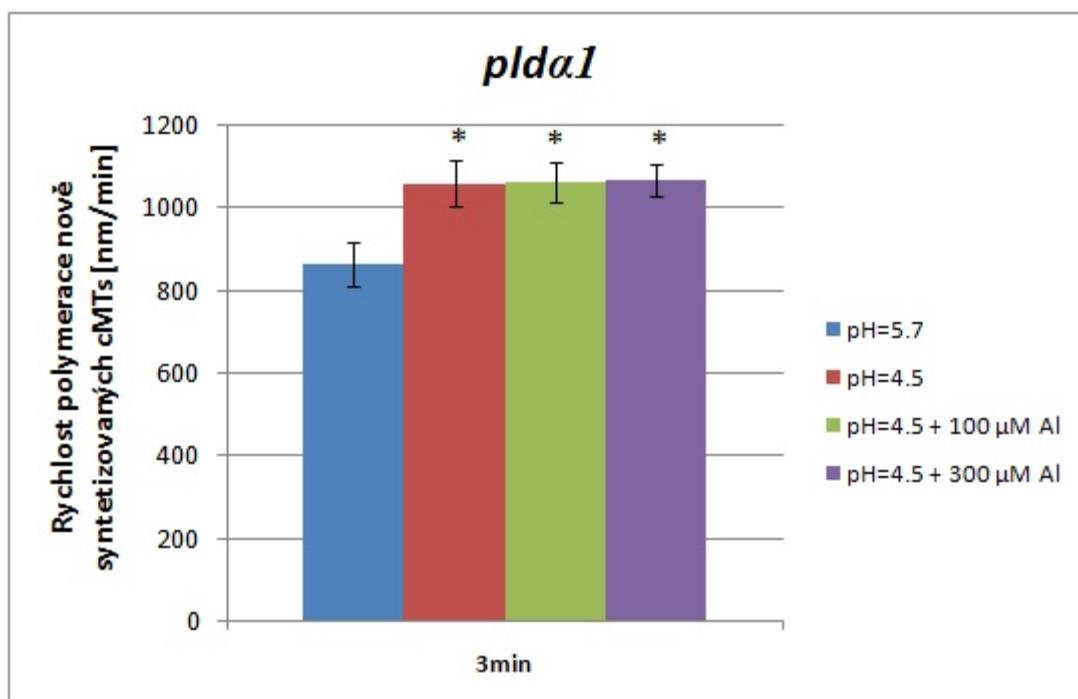
*Tab. 5 – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs v tranzientní zóně WT rostlin s EB1a-GFP markerem v čase 3, 10 a 30min po ošetření daným médiem. Uvedené hodnoty představují průměrné rychlosti polymerace ± SD*

<b><i>plda1</i></b>	<b>3 min [nm]</b>	<b>10 min [nm]</b>	<b>30 min [nm]</b>
<b>pH=5.7</b>	864±53	872±49	875±51
<b>pH=4.5</b>	1061±55	1103±62	1139±39
<b>pH=4.5 + 100 µM Al</b>	1065±49	988±48	905±34
<b>pH=4.5 + 300 µM Al</b>	1069±38	1096±42	1272±36

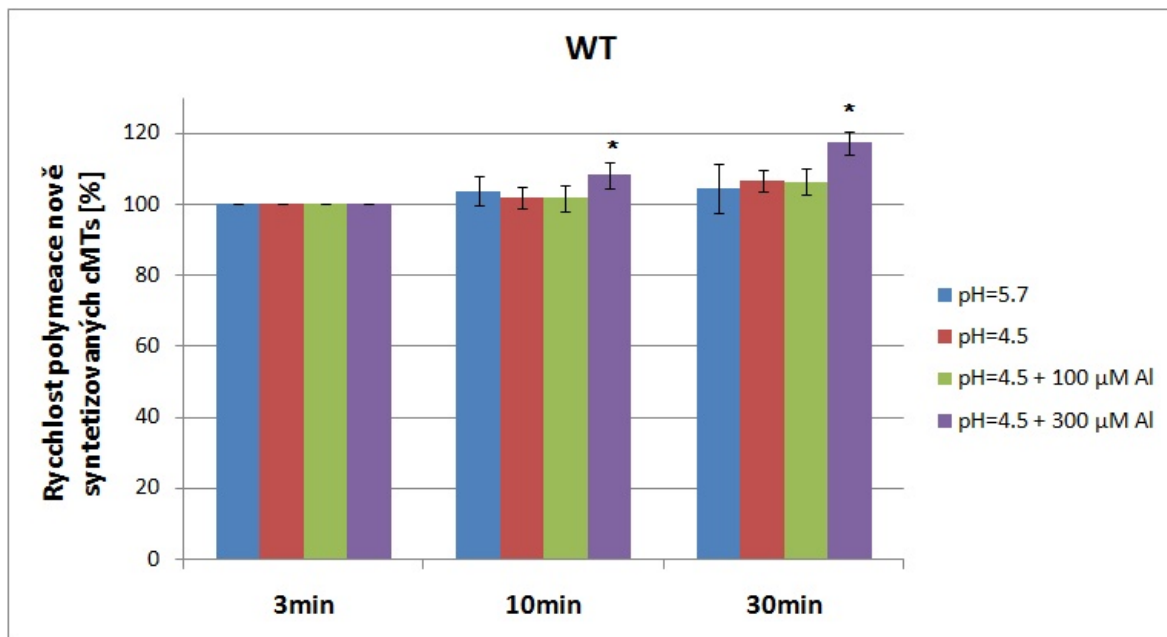
*Tab. 6 – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs v tranzientní zóně *plda1* rostlin s EB1a-GFP markerem v čase 3, 10 a 30min po ošetření daným médiem. Uvedené hodnoty představují průměrné rychlosti polymerace ± SD.*



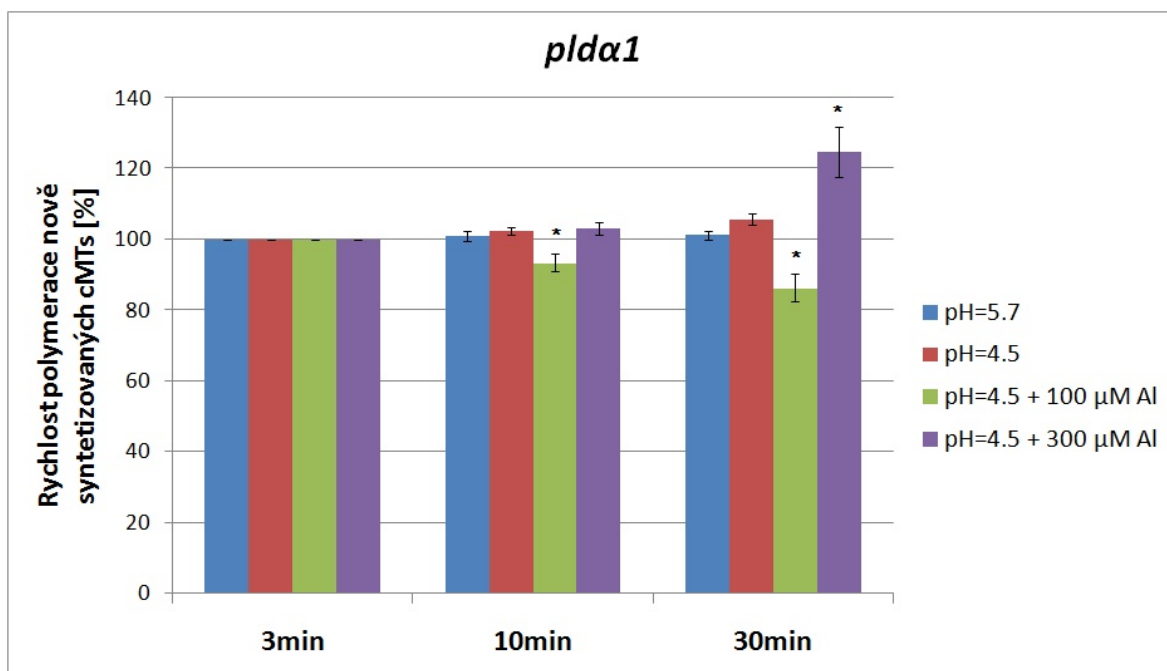
**Graf č. 5** – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMT transientní zóně kořene 3min po ošetření sníženým pH, 100 a 300  $\mu$ M koncentrací hlinitých iontů u 4-denních WT rostlin s EB1a-GFP markerkem. Chybové úsečky představují standartní chybu.



**Graf č. 6** – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMT transientní zóně kořene 3min po ošetření sníženým pH, 100 a 300  $\mu$ M koncentrací hlinitých iontů u 4-denních pld1 rostlin s EB1a-GFP markerkem. Chybové úsečky představují standartní chybu.



**Graf č. 7** – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs naměřena v čase 3, 10 a 30 min po ošetření nízkým pH a 100 a 300  $\mu$ M koncentrací hlinitých iontů u 4 denních WT rostlin s EB1a-GFP markerem. Chybové úsečky představují standartní chybu.



**Graf č. 8** – Rychlost polymerace nově syntetizovaných cMT naměřena v čase 3, 10 a 30 minut po ošetření nízkým pH a 100, 300  $\mu$ M koncentrací hlinitých iontů u 4-denních *plda1* rostlin s EB1a-GFP markerem. Chybové úsečky představují standartní chybu.

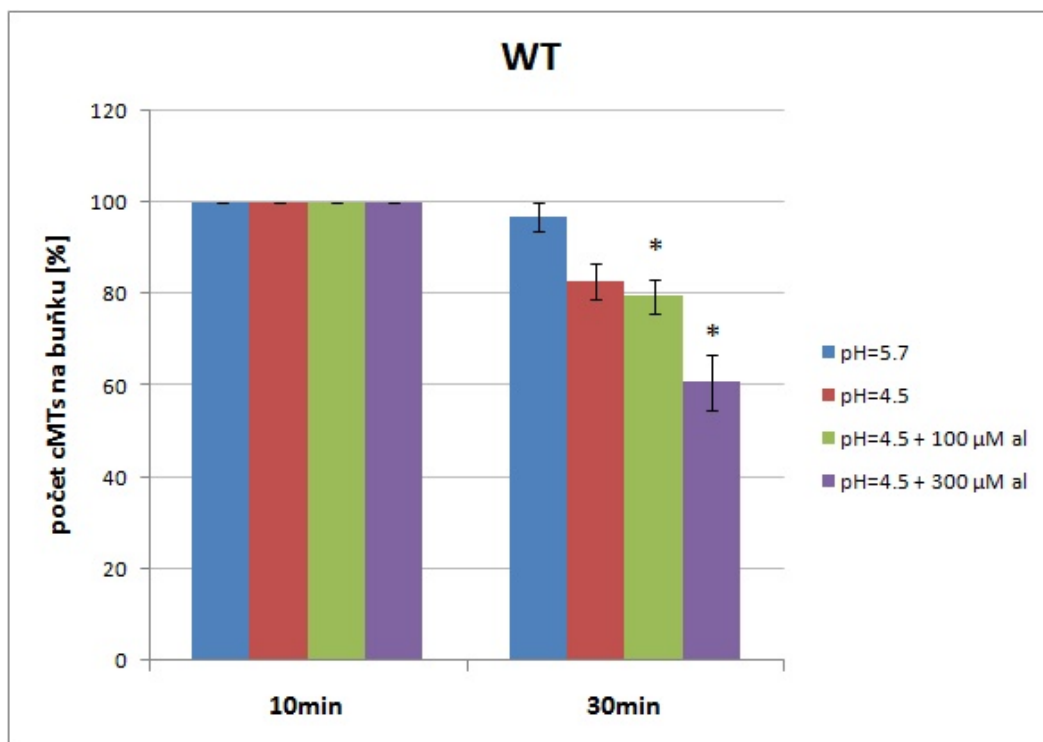
## 4.5 Studium změn počtu kortikálních mikrotubulů

Při tomto pokusu jsem si dala za úkol zjistit, zdali změny v rychlosti polymerace cMTs po ošetření hlinitými ionty nějak souvisí také s počtem nově syntetizovaných cMTs v buňce. Byly využity záznamy stejných videí jako v případě předešlého experimentu. Videá byla zprůměrována v programu Fiji (Image → Stacks → Z project → Average intensity), na základě čehož bylo možno pozorovat celé trajektorie jednotlivých + konců mikrotubulů. Počty mikrotubulů byly zjišťovány jen v čase 10 a 30 minut.

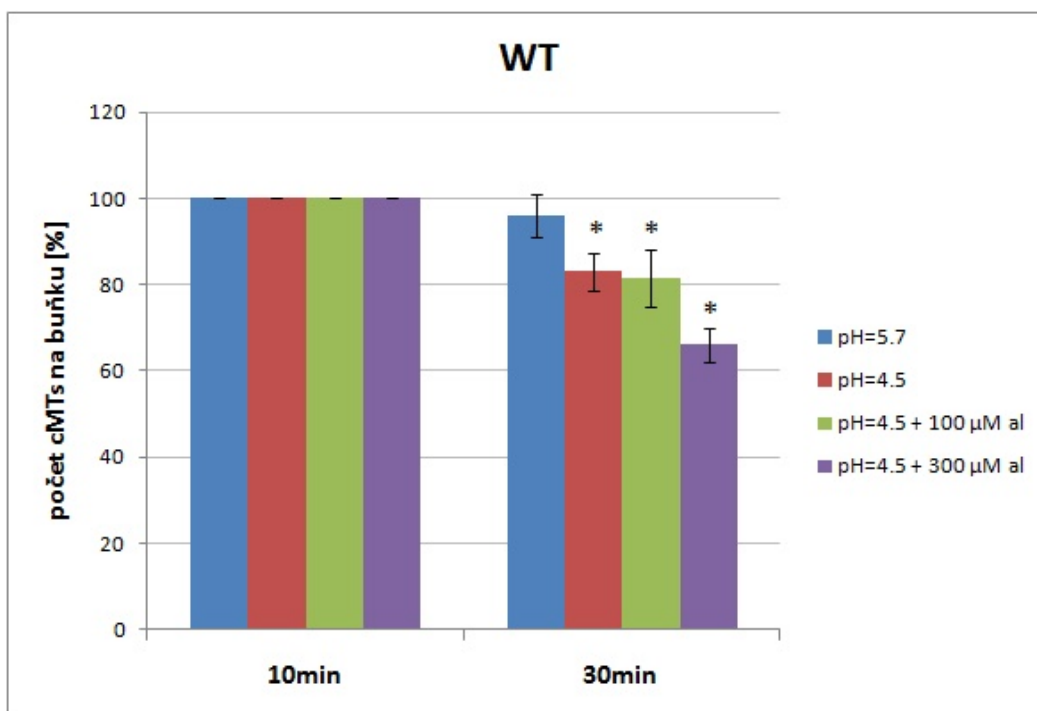
Snížení pH i nižší koncentrace hliníku vedla u WT buněk k přibližně stejnému poklesu počtu mikrotubulů. U vyšší koncentrace hlinitých iontů byl zaznamenán ještě dramatičtější pokles v počtu mikrotubulů na buňku (Graf č. 9).

Při předešlém experimentu jsem naměřila zvýšení rychlosti polymerace, očekávala bych tedy vyšší počet mikrotubulů. Proto jsem se rozhodla použít ještě GFP-TUA6 linii, abych na snímcích mohla pozorovat všechny mikrotubuly, ne jen ty polymerující (Graf č. 10). Opět jsem použila 2 kontroly (pH=4,5 a pH=5,7) a nižší, vyšší koncentraci hlinitých iontů (100 a 300  $\mu\text{M}$ ). Poté jsem spočítala počty mikrotubulů a došla jsem k velmi podobným výsledkům.

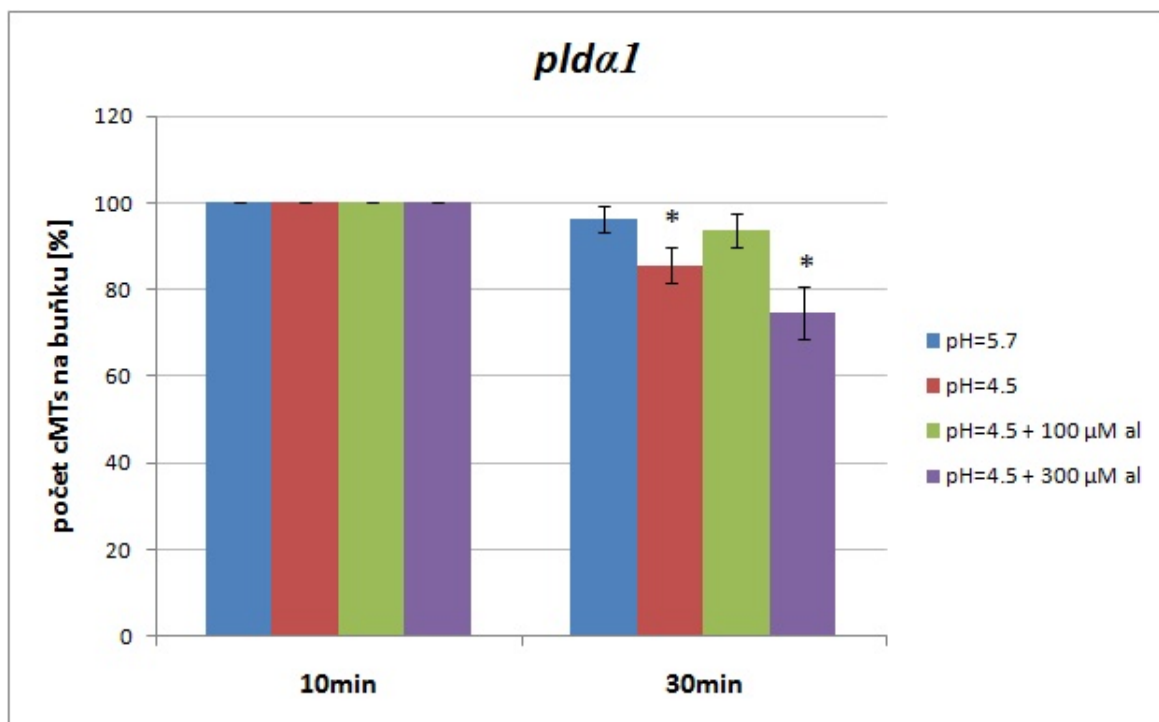
U *plda1* buněk můžeme mluvit o poklesu počtu mikrotubulů až v případě 300 $\mu\text{M}$  koncentrace hliníku (Graf č. 11). *plda1* buňky se lépe vyrovnávají s nízkým pH a nižšími koncentracemi hliníku. Na vyšší koncentrace hliníku reagují podobně jako WT buňky a to poklesem počtu cMTs, přesto je pokles jen o 25%, zatímco u WT o 40%.



**Graf č. 9** – Počet kortikálních mikrotubulů naměřených v čase 10 a 30min po ošetření nízkým pH a 100, 300  $\mu$ M  $AlCl_3$  u WT rostlin s EB1a-GFP markerem. Chybové úsečky představují standartní chybu.



**Graf č. 10** – Počet kortikálních mikrotubulů naměřených v čase 10 a 30min po ošetření nízkým pH a 100, 300  $\mu$ M  $AlCl_3$  u WT rostlin s GFP-TUA6 markerem. Chybové úsečky představují standartní chybu.

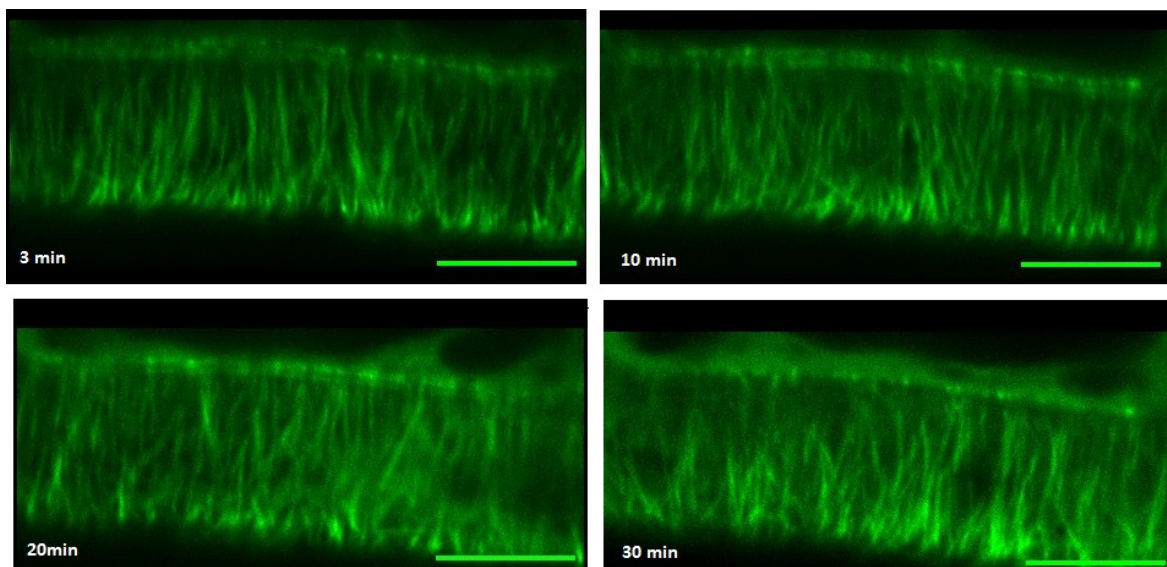


**Graf č. 11** – Počet kortikálních mikrotubulů naměřených v čase 10 a 30min po ošetření nízkým pH a 100, 300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  u *plda1* rostlin s *EB1a-GFP* markerem. Chybové úsečky představují standardní chybu.

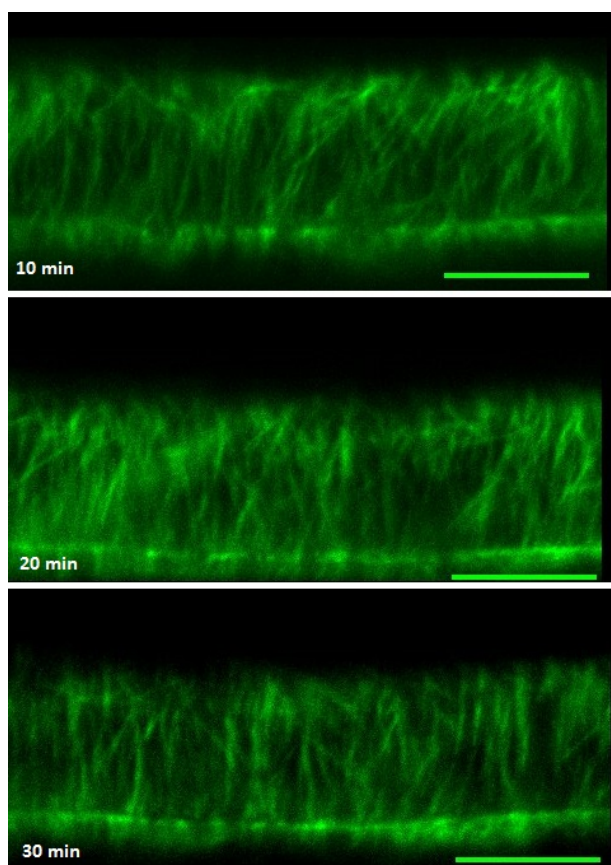
## 4.6 Toxicita hliníku a orientace kortikálních mikrotubulů

Poláková ve své diplomové práci (2014) pozorovala po 12 hodinách působení hlinitých iontů u *plda1* četné malformace buněk, naopak u WT buněk docházelo spíše k jejich odumírání. Na základě těchto výsledků bychom očekávali změnu orientace kortikálních mikrotubulů u *plda1* buněk po působení hlinitých iontů. Jak u WT při pH= 5.7 (Obr. 7), pH=4.5 (Obr. 8), pH=4.5+100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Obr. 9), pH=4.5+300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Obr. 10), tak u *plda1* při pH= 5.7 (Obr. 11), pH=4.5 (Obr. 12), pH=4.5+100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Obr. 13), pH=4.5+300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Obr. 14) nebyly ale pozorovány žádné změny v orientaci mikrotubulů v časech do 30 minut působení.

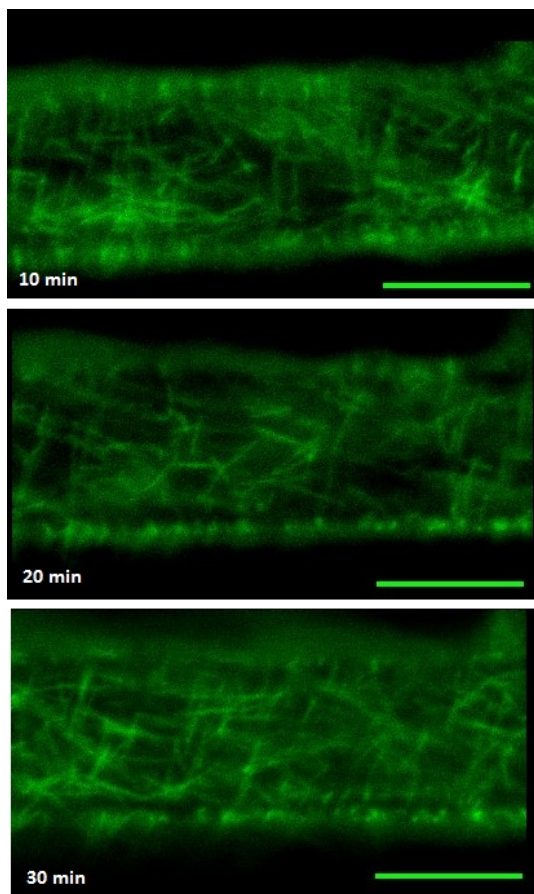




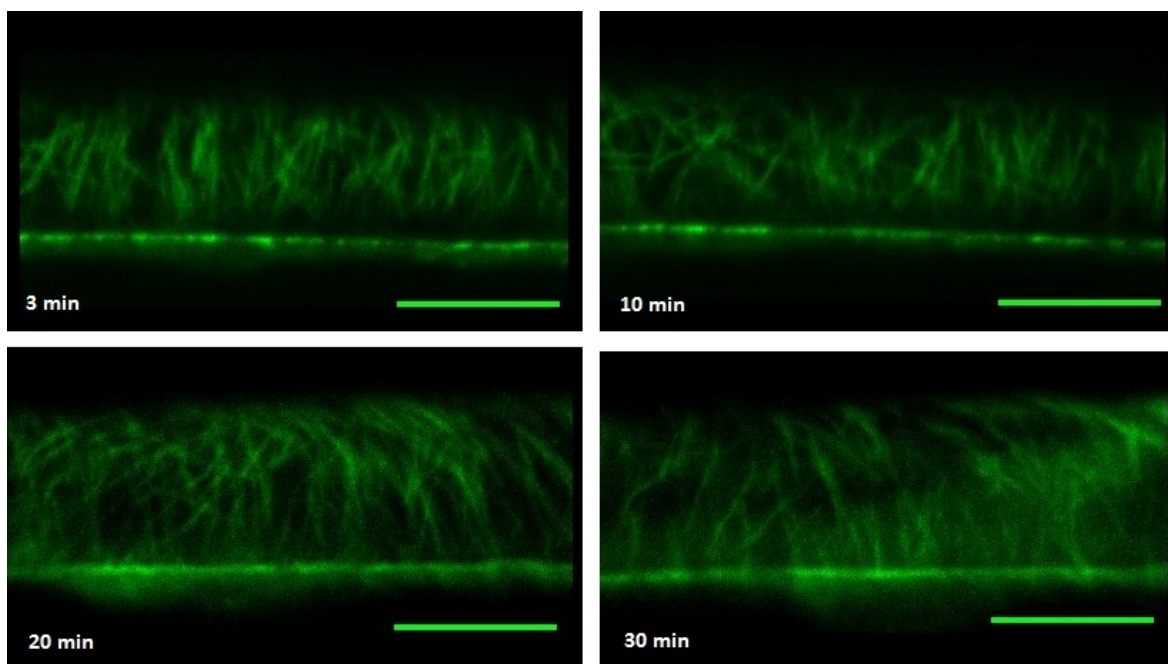
*Obr. 7 – Orientace cMT transientní zóny kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o pH=5,7 u WT rostlin, měřítko 10  $\mu$ m.*



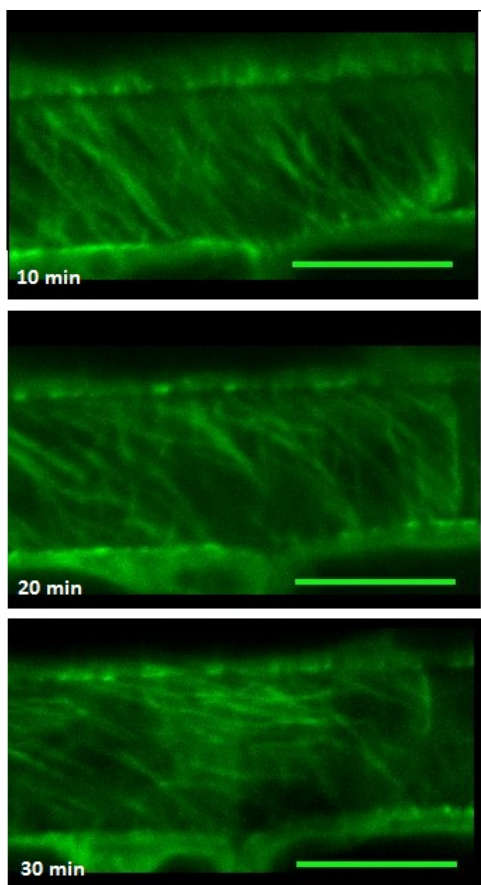
*Obr. 8 – Orientace cMT transientní zóny kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o pH=4,5 u WT rostlin, měřítko 10  $\mu$ m.*



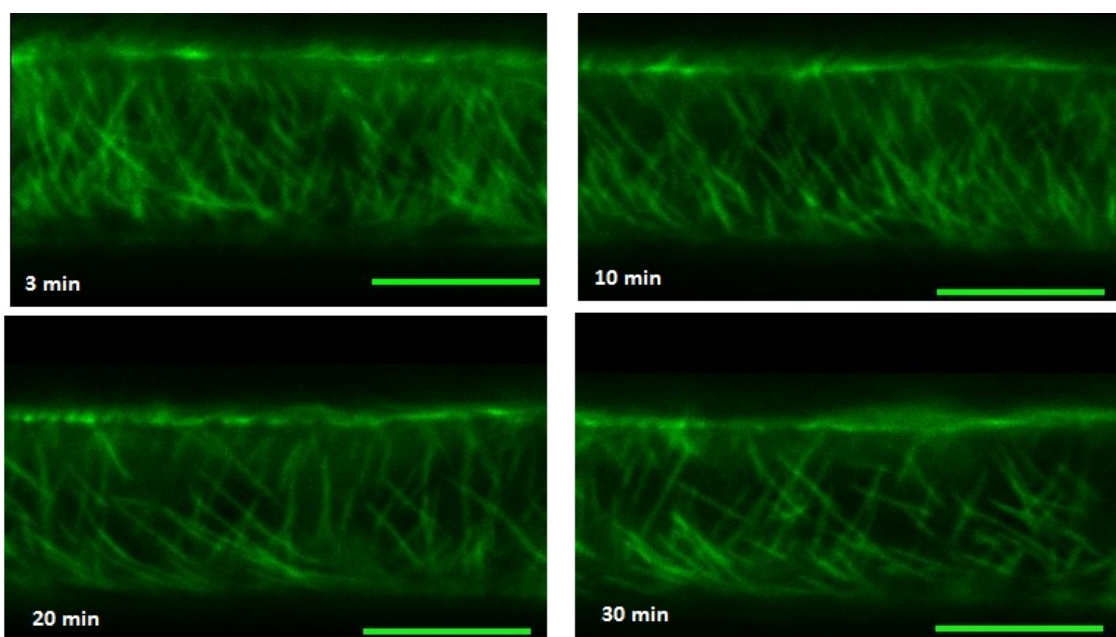
**Obr. 9** – Orientace cMT transientní zóny kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o  $pH=4,5 + 100 \mu M AlCl_3$  u WT rostlin, měřítko  $10 \mu m$ .



**Obr. 10** – Orientace cMT v transientní zóně kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o  $pH=4,5 + 300 \mu M AlCl_3$  u WT rostlin, měřítko  $10 \mu m$ .

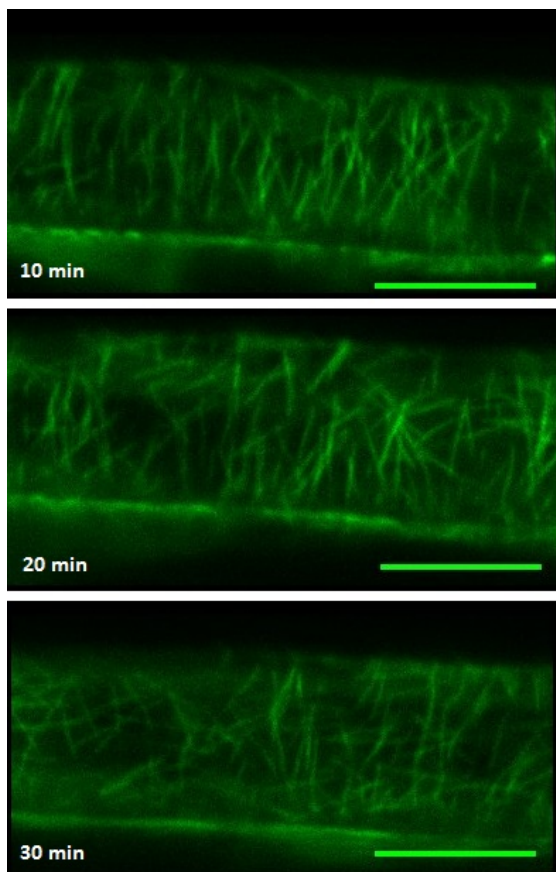


**Obr. 11** – Orientace cMT transientní zóny kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o  $pH=5,7$  u plda1 rostlin, měřítko  $10\ \mu m$ .

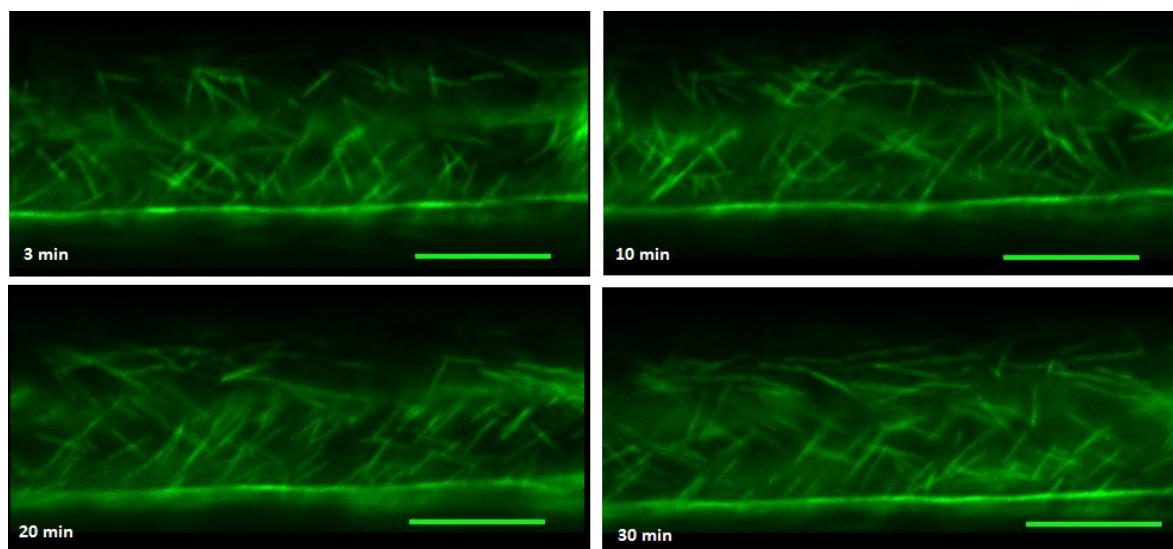


**Obr. 12** – Orientace cMT transientní zóny kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o  $pH=4,5$  u plda1 rostlin, měřítko  $10\ \mu m$ .





**Obr. 13** – Orientace cMT v transientní zóně kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o  $pH=4,5 + 100 \mu M AlCl_3$  u plda1 rostlin měřítko  $10 \mu m$ .

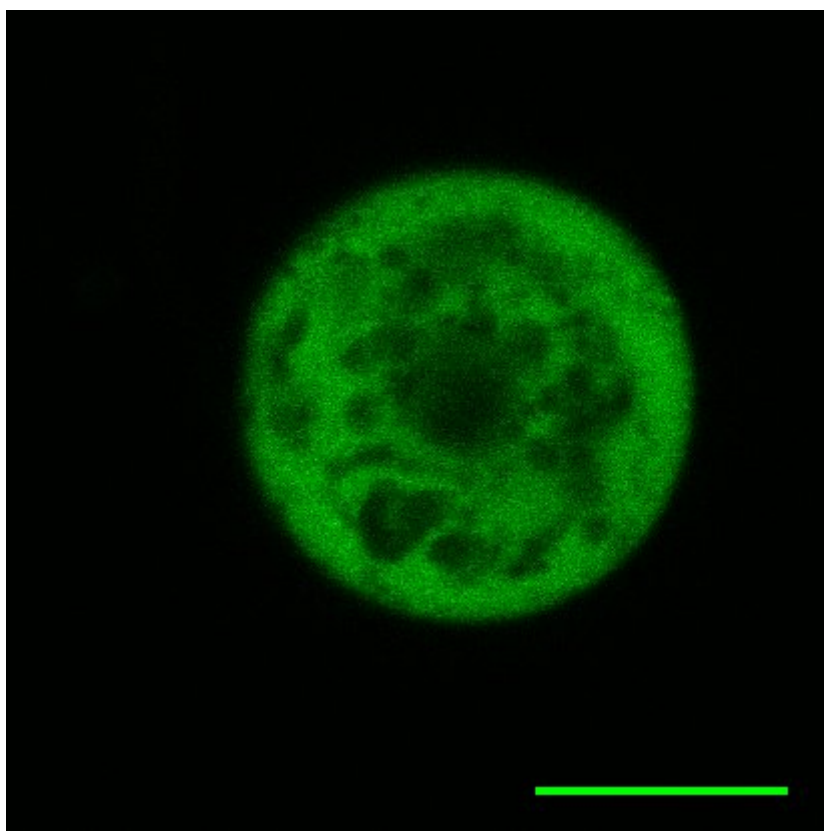


**Obr. 14** – Orientace cMT transientní zóny kořene po 3, 10, 20 a 30min v roztoku o  $pH=4,5 + 300 \mu M AlCl_3$  u plda1 rostlin, měřítko  $10 \mu m$ .

## 4.7 Protoplasty a dynamika kortikálních mikrotubulů

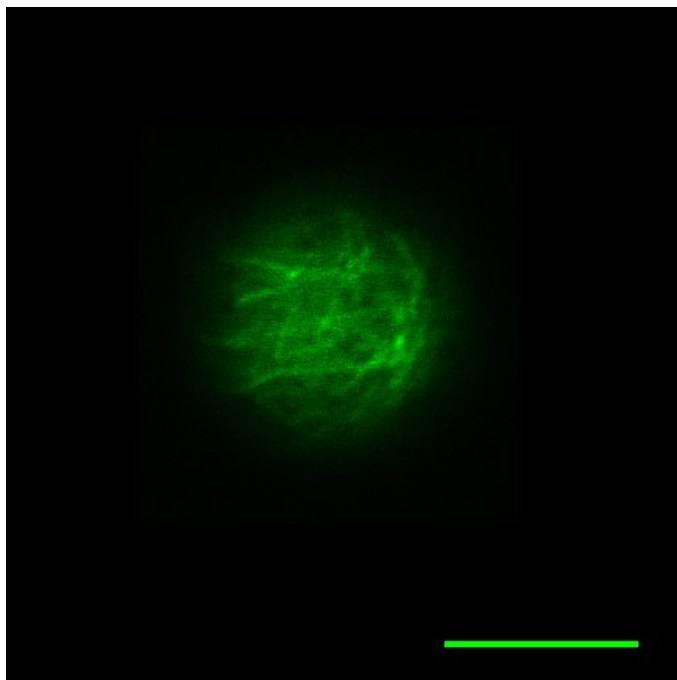
Protoplasty jsou buňky bez buněčné stěny, která sestává ze sítě celulósových mikrofibril (cMFs). U rostoucích buněk jsou celulósové mikrofibrily orientovány kolmo k rovině růstu. Orientace mikrofibril je zřejmě určována kortikálními mikrotubuly, neboť jejich orientace je paralelní k orientaci cMFs. Narušení cMTs vede ke změnám v depozici cMFs. Proto jsem chtěla zjistit, zdali bude možné v protoplastech pozorovat kortikální mikrotubuly a případně zdali se bude lišit jejich dynamika od dynamiky buněk s buněčnou stěnou. Pro tento experiment jsem zvolila WT rostliny *A. thaliana* exprimující EB1a-GFP, které jsem nechala po dobu 14 dnů růst na minimálním MS médiu v Petriho miskách. Poté byly kořeny rostlin nařezány a izolovány pouze protoplasty. Pozorování probíhalo na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880.

EB1a-GFP marker zřejmě neznačí +konce mikrotubulů v protoplastech (Obr. 15), což může souviset s odlišnou dynamikou cMTs v protoplastech a buňkách pletiv.

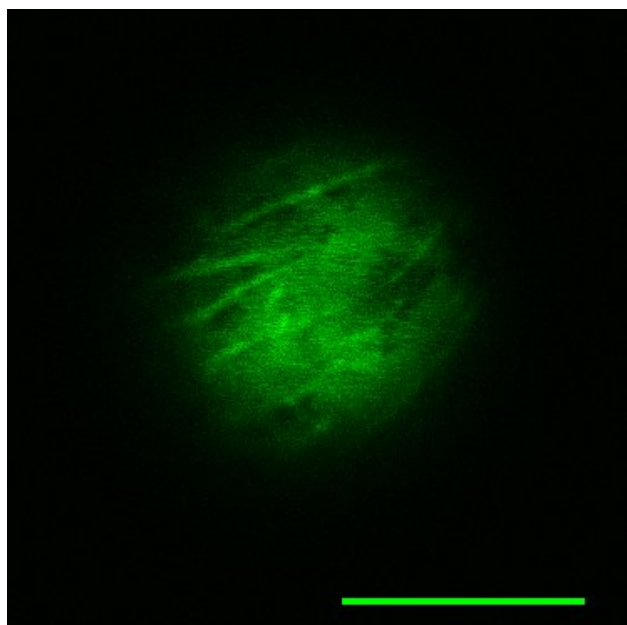


**Obr. 15** – Protoplast WT buňky s EB1a-GFP markerem, měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

V jiných publikacích (např. Zhang *et al.*, 2012) volili linii exprimující GFP-TUA6. Proto jsem se rozhodla vyizolovat protoplasty této linie a podívat se zdali se nám podaří pozorovat mikrotubuly v protoplastech buněk (viz Obr. 16 a Obr. 17)



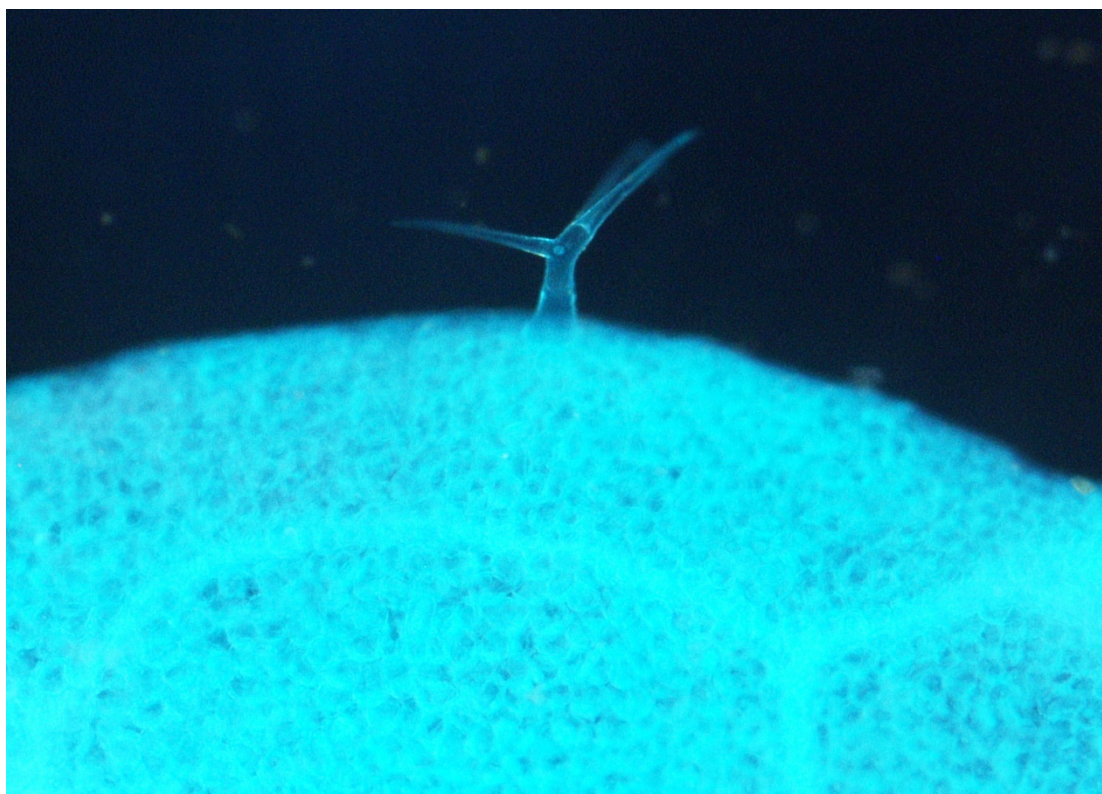
*Obr. 16 – Protoplast WT buňky s GFP-TUA6 markerem, měřítko 10  $\mu$ m.*



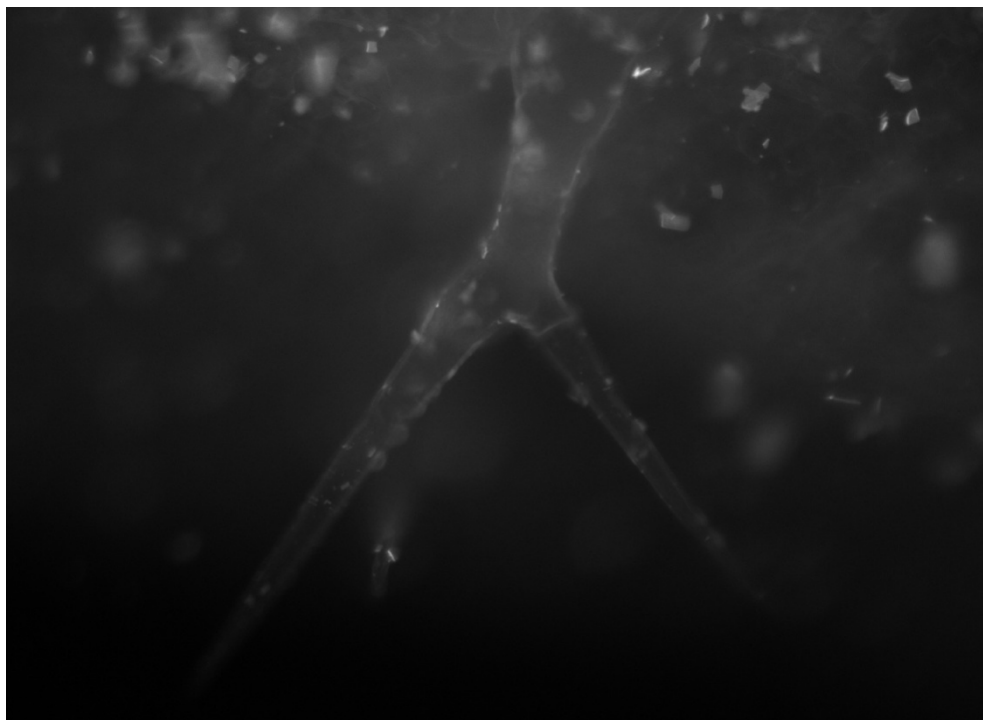
*Obr. 17 – Protoplast WT buňky s GFP-TUA6 markerem, měřítko 10  $\mu$ m.*

## 4.8 Studium akumulace hliníku v kroužku Ortmannové

Ve spolupráci s doktorem Ivanem Kulichem jsme se rozhodli zjistit, zdali dochází k akumulaci hliníku v trichomech *A. thaliana*. Při práci byl použit mutant *exo70H4-1* (Obr. 19) a jako kontrola *A. thaliana* WT (Obr. 18) ekotyp Colubia (Kulich *et al.*, 2015). *exo70H4-1* je typický tím, že netvoří kroužek Ortmannové, kalózovou strukturu na bázi trichomu, za kterým byla zaznamenána akumulace některých těžkých kovů. Pro detekci hliníku byl využit Morin, flavonoid tvořící komplexy s hliníkem. Experiment byl třikrát opakován a bohužel se nepodařilo zachytit žádný snímek potvrzující přítomnost hliníku v trichomech. Z výsledků usuzujeme, že hliník není schopen doputovat až k listům, neboť je zachycen bariérami např. už v kořeni.



**Obr. 18** – Trichom WT rostliny barvený Morinem.



***Obr. 19 – Trichom exo70H4-1 barvený Morinem.***



## 5 DISKUZE

### 5.1 Modelový materiál

Tato práce vychází z práce J. Krtkové *et al.* (2012), kde bylo zjištěno, že hliník zvyšuje rigiditu plazmatické membrány, čímž přispívá k inhibici růstu kořenů, inhibuje endocytózu a během prvních 30 minut má stabilizační efekt na mikrotubuly oproti nízkému pH, které způsobovalo jejich nahodilé uspořádání. Dále navazuje na DP Lucie Polákové (2014), která pozorovala, že rostliny postrádající PLD $\alpha$ 1 vykazují rychlejší reorientaci mikrotubulů v reakci na toxické působení hliníku oproti WT a rostlinám mutantních v PLD $\delta$  12 hodin po ošetření hlinitými ionty.

Tato diplomová práce byla vypracována za cílem zjistit, zdali bude mít hliník rozdílný vliv na dynamiku mikrotubulárního cytoskeletu WT rostlin a rostlin postrádajících funkční PLD $\alpha$ 1 a PLD $\delta$ . Z časových důvodů nebylo pracováno s *pld $\delta$* . Na rozdíl od předešlých prací byla porovnávána dynamika na rostoucím plus konci kortikálních mikrotubulů, tedy pouze jeden z aspektů chování mikrotubulů, za využití specifického EB1a-GFP markeru. Sledovanými parametry byly rychlost polymerace nově syntetizovaných kortikálních mikrotubulů, orientace nově syntetizovaných vláken a jejich počet. Dynamika mikrotubulů kořenových buněk byla pozorována bezprostředně po aplikaci hlinitých iontů, v řádu minut. Cílem bylo zjistit, zda změny v uspořádání a dynamice mikrotubulů se budou časově shodovat s inhibicí růstu kořenů. Doplňujícími experimenty bylo Morinové značení hliníku v trichomech *exo70H4-1*, WT rostlin a pozorování mikrotubulárního cytoskeletu v protoplastech EB1a-GFP a GFP-TUA6 exprimujících linií.

### 5.2 Růstová analýza kořenů

Typickým projevem hliníkové toxicity je rychlé zastavení růstu kořenů, pozorovatelné v rámci několika minut (Krtková *et al.*, 2012). U WT rostlin se zvyšující se koncentrací hlinitých iontů v roztoku se snižoval nárůst délky kořenů. 300  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> vedlo k úplné inhibici růstu kořenů. Stejně výsledky byly dosaženy v práci Illěš *et al.* (2006), kde porovnávali délky kořenů rostlin rostoucích týden na agaru s různými koncentracemi

$\text{AlCl}_3$ . *plda1* mutanty se vyrovnávaly s hlinitými ionty lépe. Celkově byly naměřeny vyšší přírůstky v délce kořenů oproti WT. Podobné výsledky byly získány i v DP Lucie Polákové (2014). 300  $\mu\text{M}$  koncentrace hliníku nevedla u *plda1* k tak výrazné inhibici růstu kořenů jako v případě WT.

Zajímavý byl vliv 100  $\mu\text{M}$  koncentrace hliníku. U WT měla podobný vliv na růst kořenů s podmínkami  $\text{pH}=4.5$ . Zřejmě tato koncentrace není pro rostliny tak kritická a vyrovnávají se spíše se sníženým  $\text{pH}$ . U *plda1* byl pozorován dokonce pozitivní vliv na růst kořenů. Délka kořenů byla srovnatelná s délkou kořenů rostoucích při  $\text{pH}=5.7$ . Zdá se, že rostliny postrádající funkční PLD $\alpha$  se vyrovnávají s hliníkovou toxicitou lépe než WT rostliny.

### **5.3 Dynamika kortikálních mikrotubulů transientní a elongační zóny kořene**

Již dříve bylo zjištěno, že transientní zóna kořene je nejcitlivější vůči působení hliníku. Sivaguru a Horst (1998) pozorovali tvorbu kalózy a akumulaci hlinitých iontů v distální části transientní zóny kořenů kukuřice. V buňkách této zóny hliník ovlivňuje také endosomy a produkci NO (Illěš *et al.*, 2006).

Rychlost polymerace naměřená v tranzientní zóně WT rostlin byla nižší než v zóně elongační při  $\text{pH}=5.7$ . Buňky meristému jsou malé, rostou pomaleji. Tranzientní zóna je oblast kořene, kde se buňky přestávají dělit a přecházejí do fáze elongační. V elongační zóně naopak buňky rychle elongují a je potřeba neustále dodávat materiál v podobě celulózy pomocí CesA komplexů, které jsou napojeny na cMTs přes protein CSI1 a zřejmě proto je rychlost polymerace cMTs vyšší než v případě zóny tranzientní. Podle Li *et al.* (2011) u buněk ošetřených 20  $\mu\text{M}$  koncentrací oryzalinu (váže se na tubulin a inhibuje polymeraci MT) došlo ke zpomalení GFP-CESA6 z  $353 \pm 68$  nm/min na  $245 \pm 72$  nm/min. Dynamika mikrotubulů bude tedy zřejmě jedním z faktorů, které pozitivně ovlivňují pohyb CesA komplexů v PM a rychlost ukládání celulózy. Je možné, že buňky elongační zóny, kde je intenzivně syntetizována buněčná stěna, vyžadují pro svou správnou funkci dynamičtější mikrotubuly, které mohou podle aktuální potřeby buňky rychle reagovat jejich přestavbou. V této DP byla naměřena průměrná rychlost polymerace nově syntetizovaných mikrotubulů v elongační zóně WT rostlin  $962 \pm 69$  nm/min při  $\text{pH}=5.7$ ,

tedy přibližně 3x vyšší než rychlost pohybu CesA komplexů, které se pohybují průměrnou rychlostí 350 nm/min (Gu *et al.*, 2010).

Nízké pH i 100  $\mu\text{M}$  koncentrace hlinitých iontů způsobovaly okamžité zvýšení rychlosti polymerace nově syntetizovaných cMTs v elongační i transienční zóně WT rostlin. V transienční zóně byl nárůst rychlosti polymerace po 3min působení mnohem vyšší než v zóně elongační (viz Tab. 1). Transienční zóna se zdá mnohem citlivější vůči změně pH a 100  $\mu\text{M}$  koncentraci hlinitých iontů. V diplomové práci Poláková (2014) zaznamenala narušení mikrotubulárního cytoskeletu elongační zóny kořene v rostlinách exprimujících GFP-TUA6 také již při 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , rozsáhlejší reorganizace při 300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . V tomto případě byl však použit jiný marker, GFP-TUA6, který se váže na tubulin a značí celé mikrotubuly (EB1 je marker pouze polymerujícího + konce MT) a změny mikrotubulární sítě byly pozorovány až po 12 hodinách působení hliníku. Přesto se mé výsledky s výsledky Polakové (2014) shodují v tom, že mikrotubuly transienční zóny reagují citlivěji na působení hlinitých iontů oproti zóně elongační. Což koresponduje s tvrzením, že transienční zóna kořene je vůči hliníku nejcitlivější (Sivaguru a Horst, 1998).

Co může způsobovat zvýšenou citlivost transienční zóny vůči hliníku? Primárním cílem  $\text{Al}^{3+}$  by mohla být nějaká molekula nebo proces, který velmi aktivně probíhá především v buňkách transienční zóny kořene. V buňkách této zóny byla zaznamenána zvýšená míra endocytózy a recyklace endocytických váčků. Navíc buňky transienční zóny internalizují hliník přes endocytózu a ten pak ovlivňuje endosomy a jejich recyklaci (Panda *et al.*, 2009). Mikrotubuly transienční zóny přecházejí z nahodilého uspořádání do transverzální orientace a je možné, že to je právě důvod jejich zvýšené citlivosti. Proces reorientace je přerušen změnami jako snížení pH, přítomnost hlinitých iontů a mikrotubuly reagují bouřlivěji, než v případě elongační zóny, kde si udržují transverzální uspořádání, které může být dále stabilizováno buněčnou stěnou.

## 5.4 Pozorování dynamiky kortikálních mikrotubulů v čase

Podle předchozích výsledků jsem se rozhodla dále zaměřit pouze na transienční zónu kořene a zjistit zdali existuje rozdíl v dynamice mikrotubulů u rostlin WT a rostlin postrádajících  $\text{PLD}\alpha 1$  během 30min působení 100 a 300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ .

#### **5.4.1 Rychlost polymerace na + konci je za kontrolních podmínek u WT a *plda1* velmi podobná**

Zajímavé je, že rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs byla za kontrolních podmínek (pH=5.7) u WT i *plda1* mutanty srovnatelná. Nefunkčnost PLD $\alpha$  tedy neovlivňuje dynamiku cMTs za kontrolních podmínek a projevuje se až při působení stresoru.

#### **5.4.2 Mikrotubuly reagují spíše na změnu pH než hlinité ionty během prvních 3 minut působení**

Bezprostředně po ošetření (čas=3min) nízkým pH a 100 a 300  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> docházelo jak u WT, tak *plda1* ke statisticky průkaznému nárůstu rychlosti polymerace oproti kontrolním podmínkám (pH=5.7). Efekt sníženého pH i hlinitých iontů na rychlost polymerace nově syntetizovaných cMTs byl srovnatelný, na základě čehož usuzuji, že hlavním faktorem ovlivňujícím rychlost polymerace během prvních 3 minut ošetření bylo právě nízké pH.

#### **5.4.3 Rychlost polymerace cMTs se po delším působení 300 $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> výrazněji zvyšuje u *plda1***

U WT docházelo po snížení pH a přidání 100  $\mu$ M koncentrace AlCl<sub>3</sub> k mírnému, statisticky neprůkaznému nárůstu rychlosti polymerace nově syntetizovaných cMTs v čase 10 a 30 minut. V obou případech byl naměřen přibližně stejný nárůst v rychlosti polymerace nově syntetizovaných vláken (viz Tab. 2). Potvrzuje se opět, že v raných fázích působení 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> reaguje buňka spíše na změnu pH, než na přítomnost hlinitých iontů (Krtková *et al.*, 2012). 300  $\mu$ M koncentrace hliníku způsobovala průkazný nárůst v rychlosti polymerace již po 10 minutách působení.

Nízké pH vedlo u *plda1* k mírnému, statisticky neprůkaznému nárůstu rychlosti polymerace nově syntetizovaných mikrotubulů během 30min. Změny zaznamenané po ošetření hlinitými ionty však jsou statisticky průkazné. Po ošetření 100  $\mu$ M koncentrací hliníku došlo k průkaznému poklesu rychlosti polymerace a to již po prvních 10 minutách (z 1065 $\pm$ 49 nm/min na 988 $\pm$ 48 nm/min). Po půl hodině byl zaznamenán další pokles rychlosti polymerace (na 905 $\pm$ 34 nm/min). 300  $\mu$ M koncentrace AlCl<sub>3</sub> vedla naopak

k nárůstu rychlosti polymerace, ale až 30 minut po ošetření hliníkem (z  $1069 \pm 38$  na  $1272 \pm 36$  nm/min).

300  $\mu$ M koncentrace způsobovala tedy zrychlení polymerace u WT i *plda1*, růst kořenů byl výrazně inhibován a snížil se počet mikrotubulů v buňce. Pokles počtu MTs může být výsledkem buď vyšší frekvence katastrof, nebo se neinicuje tvorba dostatečného množství nových MTs.

Hliník zvyšuje rigiditu membrány ihned po jeho přidání do média (Krtková *et al.*, 2012). Hypoteticky by tedy mikrotubuly WT buněk mohly setrvávat déle u membrány a možná právě vazba na membránu negativně reguluje jejich dynamiku. Za normálních podmínek je AtMAP65-1 lokalizován podél svazků kortikálních mikrotubulů. Působení stresoru (v tomto případě hliníku) vede ke změnám ve vlastnostech membrány, které aktivují PLD $\alpha$ , ta je rekrutována k membráně, kde zvyšuje lokální koncentraci PA. MAP65-1 se připojuje k membráně přes nově syntetizované molekuly PA a zvyšuje se jeho svazující aktivita, mikrotubuly jsou stabilizovány. Déletrvající stres, případně vyšší koncentrace hlinitých iontů by mohly vést k částečnému odpojení MAP65-1 od mikrotubulů a destabilizaci cMTs. K odpojení MAP65-1 od membrány může docházet v důsledku snížení produkce PA, neboť v tabákových buňkách Pejchar *et al.* (2008) detekovali pokles produkce PA po aplikaci hliníku. Mikrotubuly rostlin postrádajících funkční PLD $\alpha$  pravděpodobně nejsou stabilizovány u membrány přes PA a MAP65-1 (Zhang *et al.*, 2012). Nejsou ovlivňovány signalizací z plazmatické membrány zprostředkovanou PLD $\alpha$  a mohou tak rychleji reagovat na hlinité ionty.

Během prvních 30 minut působení 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> byl zaznamenán mírný nárůst rychlosti polymerace u WT. Krátkodobé působení této koncentrace zřejmě neoslabuje signalizaci přes PLD-PA a MAP65-1, mikrotubuly si zachovávají svou stabilitu a k nárůstu rychlosti polymerace dochází zřejmě spíše v důsledku snížení pH.

300  $\mu$ M koncentrace AlCl<sub>3</sub> vedla k nárůstu rychlosti polymerace o 17% u WT, 25% u *plda1*. Absolutně nejvyšší rychlost polymerace na plus konci mikrotubulů byla naměřena právě u *plda1* po 30 minutách působení 300  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>. Kortikální mikrotubuly rostlin postrádajících enzym PLD $\alpha$ 1 reagují rychleji na stresové podmínky, což je zřejmě způsobeno tím, že není jejich dynamika omezována vazbou MAP65-1 k membráně. Co by tedy mohlo ovlivňovat dynamiku mikrotubulů, když ne signály z membrány? Hliník je schopen vytěšňovat jiné, kladně nabitě ionty z membrány, jako např. Ca<sup>2+</sup>. Zvýšená

koncentrace cytosolického vápníku vede k depolymeraci mikrotubulů (Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). Zvyšuje se hladina volného tubulinu v cytoplazmě a s ním i rychlost polymerace nově syntetizovaných vláken.

#### 5.4.4 100 $\mu\text{M}$ $\text{AlCl}_3$ má u *plda1* benefiční účinky

Zajímavá byla reakce rostlin *plda1* na 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Zdá se, že tato koncentrace má pozitivní vliv na *plda1* v porovnání s působením samotného nízkého pH. Délka kořenů rostoucích v médiu o 100  $\mu\text{M}$  koncentraci hlinitých iontů byla srovnatelná s těmi, které rostly v kontrolním médiu o  $\text{pH}=5.7$  (viz graf. 3). Rychlost polymerace během 30 minut poklesla na hodnotu blízkou hodnotě rychlosti polymerace při  $\text{pH}=5.7$  (viz tab. 3) a nedocházelo k poklesu počtu mikrotubulů. Ačkoliv bezprostředně po vložení kořene do média došlo k nárůstu rychlosti polymerace, po delším působení se její hodnota snižovala opět na hodnotu naměřenou v kontrolních podmínkách, v porovnání se samotným snížením pH. Pravděpodobně se nejednalo o technickou chybu experimentu, neboť benefiční účinky 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  na *plda1* byly pozorovány nezávisle při růstové analýze kořenů a měření rychlosti polymerace cMTs. U některých rostlin byly pozorovány benefiční účinky hliníku a bylo by zajímavé studovat, jakou roli sehrává v tomto jevu PLDa.

### 5.5 Studium změn počtu kortikálních mikrotubulů

Chtěla jsem zjistit, zdali se změny v rychlosti polymerace nově syntetizovaných cMTs nějakým způsobem promítnou v počtu mikrotubulů. Hustota mikrotubulární sítě byla vyhodnocována ze snímků pořízených na EB1a-GFP markeru. Pro zjištění, zdali je tento marker vhodný pro studium celkové mikrotubulární sítě a nejsou v analýze opomíjeny stabilní mikrotubuly, které nevykazují polymeraci na + konci, byl experiment opakován s GFP-TUA6 markerem, který je lokalizován po celé délce mikrotubulů. Výsledky se pro oba dva markery shodovaly. EB1a-GFP je tedy vhodný marker pro měření hustoty mikrotubulární sítě.

Obecně vedlo jakékoliv ošetření k poklesu počtu mikrotubulů. Odlišné výsledky však byly získány u *plda1* při ošetření 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , kde nebyly detekovány statisticky

průkazné změny v počtu mikrotubulů. Opět se potvrzuje, že krátkodobé působení této koncentrace není pro *plda1* toxické, ale spíše benefiční.

Zvyšování rychlosti polymerace a snižování hustoty mikrotubulární sítě by mohlo být vysvětleno tak, že pravděpodobně během ošetření nedochází k iniciaci tvorby dostatečného množství nových cMTs a celkově je mikrotubulární síť méně hustá. Další možností by mohla být větší pravděpodobnost srážek mezi mikrotubuly a zvýšená četnost katastrof (Chi a Ambrose, 2016).

Nelze vyloučit ani situaci, kdy by mohlo docházet primárně k depolymeraci cMTs, čímž by se zvyšovala koncentrace tubulinu v cytoplazmě a následně by se zvyšovala rychlost polymerace na rostoucím plus konci díky zvyšující se dostupnosti tubulinových podjednotek (Walker *et al.*, 1988). Nejrychlejší polymerace byla však zaznamenána u *plda1* při 300  $\mu\text{M}$  koncentraci hlinitých iontů, přitom ale docházelo k menšímu poklesu v počtu mikrotubulů oproti WT, kde polymerace na + konci byla pomalejší. Závislost rychlosti polymerace nově syntetizovaných cMTs na celkovém snižování počtu mikrotubulů tedy dle těchto výsledků není přímo úměrná. Tato možnost je tedy pouze hypotetická a bylo by potřeba ji detailněji prostudovat. Změny stability mikrotubulární sítě se zdají být důležitým faktorem při odpovědi rostlin na působení různých stresů.

Zhang *et al.* (2012) pozorovali, že ztráta PLD $\alpha$  vede k silněji narušeným mikrotubulům v počáteční fázi působení stresu zasolením. *plda* knockout mutanty jsou hypersenzitivní vůči zasolení. V buňkách hypokolu *plda1* dramaticky klesl počet kortikálních mikrotubulů po 24 hodinách v médiu s 50 mM koncentrací NaCl oproti WT buňkám a rostliny byly senzitivnější vůči stresu zasolením. Naopak bylo taky zjištěno, že destabilizace mikrotubulů v časně fázi působení stresoru může být přínosná pro přežití rostliny. Při stresu zasolením (100 mM NaCl) u buněk, u kterých byly mikrotubuly uměle stabilizovány, docházelo přednostně k jejich odumírání v reakci na stres (Wang *et al.*, 2007). Depolymerace cMTs je zřejmě způsobená degradací SPR1 a je následována tvorbou nové mikrotubulární sítě (Wang *et al.*, 2011). Přechodná destabilizace mikrotubulů se zdá být důležitou i pro chladovou odolnost (Abdrakhamanova *et al.*, 2003).

V mých experimentech *plda1* rostliny vykazující vyšší dynamiku mikrotubulů na plus konci odolávají lépe stresu. Pokles v počtu mikrotubulů byl poněkud menší než u WT. Zprv je možné, že se dynamika cMTs v jednotlivých rostlinných orgánech liší a mikrotubuly reagují odlišně na působení stresoru (viz hypokotyl - Zhang *et al.* 2012,

kořeny - tato práce a práce Poláková *et al.* 2014). Za druhé se může lišit signální dráha zapojená do odpovědi na stres zasolením a stres vyvolaný hlinitými ionty. V každém případě moje experimenty naznačují pozitivní korelaci mezi zvýšenou dynamikou mikrotubulů a vyšší odolností buněk při stresu vyvolaném hlinitými ionty.

## 5.6 Vliv toxicity hliníku na orientaci kortikálních mikrotubulů

Poláková (2014) pozorovala po 12 hodinách působení 300  $\mu\text{M}$  koncentrace  $\text{AlCl}_3$  četné malformace buněk u *plda1*. Motes *et al.* (2005) zase zjistili, že N-acyletanolamin (inhibitor PLD $\alpha$ ) indukuje přednostně reorganizaci mikrotubulů než jejich depolymeraci. Na základě těchto výsledků bychom očekávali, že změny ve tvaru buněk u *plda1* budou souviset se změnami orientace cMTs.

V této diplomové práci však nebyly pozorovány změny v orientaci mikrotubulů ani po 30 minutách v 1/8 MS médiu s nízkým pH, 100 a 300  $\mu\text{M}$  koncentrací  $\text{AlCl}_3$  a to jak u WT, tak mutantních rostlin. V raných fázích působení hlinitých iontů dochází tedy spíše ke změnám v dynamice mikrotubulů a hustotě mikrotubulární sítě. Delší působení, v řádu hodin, pak vede ke změnám orientace cMTs. Výsledky mé diplomové práce naznačují, že *plda1* rostliny mají dynamičtější mikrotubuly v reakci na hlinité ionty a nízké koncentrace hliníku mohou být dokonce výhodou v prvních minutách jeho působení. Vyšší dynamika mikrotubulů u *plda1* buněk může vysvětlovat jejich vyšší odolnost během déletrvajícího působení hlinitých iontů (malformace buněk převažují nad jejich odumíráním).

V práci Krtkové *et al.* (2012) půl hodina v roztoku 1% sacharózy o pH=4.0 způsobila nahodilé uspořádání mikrotubulů. Při mých experimentech nedocházelo k reorientaci mikrotubulů ani u WT, ani u mutantních rostlin. V práci Krtková *et al.* (2012) bylo pro minimalizaci interakcí  $\text{Al}^{3+}$  s médiem zvoleno médium 1% sacharózy a pozorovány byly laterální buňky kořenové čepičky. Změny orientace mikrotubulů, které byly v práci Krtková *et al.* (2012) zaznamenány souvisely tedy zřejmě s buněčným typem a složením média.

Po shrnutí mých výsledků a výsledků Polákové (2014) lze říci, že PLD $\alpha$ 1 enzym se podílí na odpovědi rostlin na stres vyvolaný hlinitými ionty, pravděpodobně díky účasti



v signální dráze regulující mikrotubuly. *plda1* buňky vykazovaly během stresu větší dynamiku na + konci mikrotubulů a v menší míře depolymerovaly. Nízká koncentrace hliníkových iontů měla během krátkodobého působení hned v několika aspektech benefiční účinky.

## 5.7 Dynamika cMTs v protoplastech buněk

Protoplasty jsou "nahé" buňky bez buněčné stěny, která může být odstraněna mechanicky či enzymaticky. Je známo, že buněčnou stěnu tvoří z velké části celulózové mikrofibrily a směr jejich ukládání je dán orientací kortikálních mikrotubulů. Zajímalo mě proto, zdali u buněk postrádajících buněčnou stěnu bude možno pozorovat dynamiku kortikálních mikrotubulů. V kořenových ani listových protoplastech linie exprimující EB1a-GFP nebyly pozorovány žádné plus konce mikrotubulů. V jiných studiích bývá využívána pro pozorování mikrotubulární sítě spíše linie GFP-TUA6, pomocí které jsem opravdu dobře pozorovatelná celá vlákna mikrotubulů (Zhang *et al.*, 2012). EB1a-GFP marker zřejmě neznačí plus konce mikrotubulů v protoplastech, což může souviset s odlišnou dynamikou mikrotubulů v protoplastech a buňkách pletiv.

## 5.8 Studium akumulace hliníku v kroužku Ortmannové

V roce 2015 byla laboratoří doc. Viktora Žárského u *Arabidopsis* popsána nová struktura na bázi trichomu, kalózový kroužek, pojmenovaný kroužek Ortmannové. Nad tímto kroužkem byla zaznamenána akumulace těžkých kovů (např. kadmia). EXO70H4 je podjednotka exocystu (konzervovaný proteinový komplex zajišťující polarizovanou sekreci váčků na PM), která je silně exprimována právě v trichomech. Mutanty v EXO70H4 postrádají kroužek Ortmannové a sekundární buněčnou stěnu.

Při experimentu byl použit mutant *exo70H4-1*, u kterého jsem předpokládala, že nebudu detekovat hliník v trichomech, a *Arabidopsis* WT ekotyp Columbia. Nepodařilo se prokázat přítomnost hliníku v trichomech za kroužkem Ortmannové. Hliník je zřejmě rostlinou vychytáván již v kořenových buňkách, rostlina se snaží zabránit jeho transportu do dalších buněk a do trichomů tak nemá šanci doputovat.

## 6 ZÁVĚR

Bylo zjištěno, že polymerace nově syntetizovaných mikrotubulů je mnohem rychlejší v elongační zóně kořene. Naopak se podařilo potvrdit, že tranzientní zóna kořene má mnohem citlivější mikrotubuly vůči hlinitým iontům než zóna elongační.

Rostliny postrádající enzym PLD $\alpha$ 1 vykazovaly mnohem vyšší dynamiku na plus koncích mikrotubulů než WT během AlCl<sub>3</sub> stresu, což jim umožňovalo rychleji reagovat na stresové podmínky. 100  $\mu$ M koncentrace AlCl<sub>3</sub> měla benefiční vliv na růst kořenu u *pld $\alpha$ 1*.

Dynamika mikrotubulů v protoplastech se zřejmě liší od dynamiky v buňkách pletiv, neboť nebylo možno pomocí EB1a-GFP markeru vizualizovat plus konce mikrotubulů.

Hliník se akumuluje především v kořenech. V trichomech nebyla detekována jeho přítomnost.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdrakhamanova, A., Wang, Q. Y., Khokhlova, L., Nick, P.** (2003) Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiology*, 44, 676-686.
- Akhmanova, A. a Steinmetz, M. O.** (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 309-322.
- Ahn, S. J. a Matsumoto, H.** (2006) The role of the plasma membrane in the response of plant roots to aluminum toxicity. *Plant Signaling & Behavior*, 1(2): 37-45.
- Binarová, P., Cenklová, V., Procházková, J., Doskočilová, A., Volc, J., Vrlík, M., Bögre, L.** (2006)  $\gamma$ -tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18, 1199-1212.
- Bisgrove, S. R., Lee Y-R. J., Liu, B., Peters, N. T., Kropf, D. L.** (2008) The microtubule plus-end binding protein EB1 functions in root responses to touch and gravity signals in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20, 396-410.
- Brunner, I. a Sperisen, Ch.** (2013) Aluminium exclusion and aluminium tolerance in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 4:172.
- Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H., Lloyd, C. W.** (2003) EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology*, 5, 967-971.
- Chang, Y. C., Yamamoto, Y., Matsumoto H.** (1999) Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) cells treated with a combination of aluminium and iron. *Plant, Cell and Environment*. 22, 1009-1017.
- Chi, Z. a Ambrose, Ch.** (2016) Microtubule encounter-based catastrophe in *Arabidopsis* cortical microtubule arrays. *BMC Plant Biology*, 16:18.
- Dhonukshe, P., Laxalt, A. M., Goedhart, J., Gadella, T. W. J., Munnik, T.** (2003) Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *The Plant Cell*, 15, 2666-2679.
- Eliáš, M., Potocký, M., Cvrčková F., Žárský, V.** (2002) Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC Genomics*, 3:2.
- Futurani, I., Watanabe, Y., Prieto, R., Masukawa, M., Suzuki, K., Naoi, K., Thitamadee, S., Shikanai, T., Hashimoto, T.** (2000) The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127, 4443-4453.
- Galva, Ch., Kirik, V., Lindeboom, J. J., Kaloriti, D., Rancour, D. M., Hussey, P. J., Bednarek, S. Y., Ehrhardt, D. W., Sedbrook, J. C.** (2014) The microtubule plus-end tracking proteins SPR1 and EB1b interact to maintain polar cell elongation and directional organ growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26, 4409-4425.

**Gardiner, J. C., Harpet, J. D. I., Weerakoon, N. D., Collings, D. A., Ritchie, S., Gilroy, S., Cyr, R. J., Marc, J.** (2001) A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell*, 13, 2143-2158.

**Gu, Y., Kaplinsky, N., Bringmann, M., Cobb, A., Carroll, A., Sampathkumar, A., Baskin, T. I., Persson, S., Somerville, Ch. R.** (2010) Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis. *PNAS*, 107, 12866–12871.

**Hamada, T., Igarashi, H., Itoh, T. J., Shimmen, T., Sonobe, S.** (2004) Characterization of a 200 kDa microtubule-associated protein of tobacco BY-2 cells, a member of the XMAP215/MOR1 family. *Plant Cell Physiology*, 45, 1233-1242.

**Hayashi, I. a Ikura, M.** (2003) Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *Journal of Biological Chemistry*, 278, 36430-36434.

**Heath, I. B.** (1974) A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis. *Journal of Theoretical Biology*, 48, 445–449.

**Horst, W. J., Schmohl, N., Kollmeier, M., Baluška, F., Sivaguru, M.** (1999) Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall – plasma membrane – cytoskeleton continuum? *Plant and Soil*, 215, 163-174.

**Horst, W. J., Kollmeier, M., Schmohl, N., Sivaguru, M., Wang, Y., Felle, H. H., Hedrich, R., Schröder, W., Staß, A.** (2007) Significance of the root apoplast for aluminium toxicity and resistance of maize. *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*, 49-56.

**Hung, W-J., Oo, T. L., He, H-Y., Wang, A-Q., Zhan, J., Li, Ch-Z., Wei, S-Q., He, L-F.** (2014) Aluminum induces rapidly mitochondria-dependent programmed cell death in Al-sensitive peanut root tips. *Botanical Studies*, 55: 67.

**Illéš, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluška, F., Ovečka, M.** (2006) Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, 57, 4201-4213.

**Jones, D. L., Blancaflor, E. B., Kochian, L. V., Gilroy, S.** (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 29, 1309–1318.

**Kao, K. N., Michayluk, M. R.** (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126, 105-110.

**Kawamura, E. a Wasteneys, G. O.** (2008) MOR1, the *Arabidopsis thaliana* homologue of *Xenopus* MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules *in vivo*. *Journal of Cell Science*, 121, 4114-4123.

**Kopittke, P. M., Moore, K. L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B. J., Blamey, F. P. C., Menzies, N. W., Nicholson, T. M., Mckenna, B. A., Wang, P., Gresshoff, P., Kourousias, G., Webb, R. I., Green, K., Tollenaere, A.** (2015) Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant rous. *Plant Physiology*, 167, 1402-1411.

**Krtková, J., Havelková, L., Křepelová, A., Fišer, R., Vosolobě, S., Novotná, Z., Martinec, J., Schwarzerová, K.** (2012) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminium-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 88-97.

**Kulich, I., Vojtková, Z., Glanc, M., Ortmannová, J., Rasmann, S., Žárský, V.** (2015) Cell wall maturation of *Arabidopsis* trichomes is dependent on exocyst subunit exo70H4 and involves callose deposition. *Plant Physiology*, 168, 120-131.

**Li, J-F., Park, E., Arnim, A., Nebenführ, A.** (2009) The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods*, 5:6.

**Lin, F., Qu, Y., Zhang, Q.** (2014) Phospholipids: Molecules regulating cytoskeletal organization in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signalling and Behavior*, 9: e28337.

**Liu, J. a Han, R.** (2015) The evolution of microtubule end-binding protein 1 (EB1) and roles in regulating microtubule behavior. *American Journal of Plants Sciences*, 6, 2114-2121.

**Lucas, J. R., Courtney, S., Hassfurder, M., Dhingra, S., Bryant, A., Shaw, S. L.** (2011) Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *The Plant Cell*, 23, 1889-1903.

**Macdonald, T. L., Humphreys, W. G., Martin, R. B.** (1987) Promotion of tubulin assembly by aluminium ion *in vitro*. *Science*, 236, 183-186.

**Moritz, M., Braunfeld, M. B., Guénebaut, V., Heuser, J., Agard, D. A.** (2000) Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nature Cell Biology*, 2, 236-270.

**Motes, Ch. M., Pechter, P., Yoo, Ch. M., Wang, Y., Chapman, K. D., Blancaflor, E. B.** (2005) Differential effects of two phospholipase D inhibitors 1-butanol and N-acyl ethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth. *Protoplasma*, 226, 109-123.

**Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P. J., Hauser, M-T.** (2004) The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic fragment function. *Current Biology*, 14, 412-417.

**Nakajima, K., Kawamura, T., Hashimoto, T.** (2006) Role of the SPIRAL1 gene family in anisotropic growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47, 513–522.

**Nelson, B. K., Cai, X., Nebenführ, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *The Plant Journal*, 51, 1126–1136.

**Panda, S. K., Baluška, F., Matsumoto, H.** (2009) Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signalling and Behavior*, 4, 592-597.

**Pejchar, P., Pleskot, R., Schwarzerová, K., Martinec, J., Valentová, O., Novotná, Z.** (2008) Aluminium ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. *Cell Biology International*, 32, 554-556.

**Pejchar, P., Potocký, M., Novotná, Z., Veselková, Š., Koucourková, D., Valentová, O., Schwarzerová, K., Martinec, J.** (2010) Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells. *New Phytologist*, 188, 150-160.

**Pierzynski, G. M., Sims, J. T., Vance, G. F.**, 2000. *Soils and Environmental Quality*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 459 s.

**Pleskot, R., Li, J., Žárský, V., Potocký M., Staiger, Ch. J.** (2013) Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in Plant Science*, 18, 496-504.

**Poláková, Lucie.** *Role PLD v raných fázích toxického působení hliníku*. Praha, 2014. Diplomová práce. UK, PřF, katedra experimentální biologie rostlin.

**Potocký, M., Eliáš, M., Profotová, B., Novotná, Z., Valentová, O., Žárský, V.** (2003) Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. *Planta*, 217, 122-130.

**Qin, Ch., Wang, C., Wang, X.** (2002) Kinetic analysis of *Arabidopsis* phospholipase D. *The journal of biological chemistry*, 277, 49685–49690.

**Ramos-Díaz, A., Brito-Argaez, L., Munnik, T., Hernandez-Sotomayor, S. M. T.** (2007). Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta*, 225, 393-401.

**Rengel, Z. a Zhang, W-H.** (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159, 295-314.

**Ruelland, E., Kravets, V., Derevyanchuk, M., Martinec, J., Zachowski, A., Pokotylo, I.** (2015) Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 129-143.

**Ryan, P. R., Dito Maso, J. M., Kochian, L. V.** (1993) Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany*, 44, 437-446.

- Sandblad, L., Busch, K. E., Tittmann, P., Gross, H., Brunner, D., Hoenger, A.** (2006) The Schizosaccharomyces pombe EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell*, 127, 1415-1424.
- Schmit, A. C.** (2002). Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *International Review of Cytology*, 220, 257–289.
- Schwarzerová, K., Zelenková, S., Nick, P., Opatrný, Z.** (2002) Aluminium-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of *Tobacco* cell lines. *Plant Cell Physiology*, 43 (2), 207-216.
- Shen, R. a Ma, J. F.** (2001) Characterization of a 200 kDa microtubule-associated protein of tobacco BY-2 cells, a member of the XMAP215/MOR1 family. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1683-1687.
- Silva, S.** (2012) Aluminium toxicity targets in plants. *Journal of Botany*, 2012.
- Sivaguru, M. a Horst, W. J.** (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminium-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116, 155-163.
- Sivaguru, M., Fujivara, T., Šamaj, J., Baluška, F., Yang, Z., Osawa, H., Maeda, T., Mori, T., Volkman, D., Matsumoto, H.** (2000) Aluminum-induced 1, 3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology*, 124, 991-1006.
- Sivaguru, M., Pike, S., Gassmann, W., Baskin, T. I.** (2003) Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiology*, 44, 667-675.
- Smertenko, A. P., Chang, H-Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M-T., Hussey, P. J.** (2004) The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: Molecular analysis of its microtubule bundling activity. *The Plant Cell*, 16, 2035-2047.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., Vantard, M.** (2006) Katanin's severing activity favors bundling of cortical microtubules in plants. *The Plant Journal*, 46, 1009-1017.
- Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D., Geelen, D.** (2004b). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiology*, 136, 3956–3967
- Vassileva, V. N., Fujii, Y., Ridge, R. W.** (2005) Microtubule dynamics in plants. *Plant Biotechnology*, 22, 171-178.
- Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P., Salmon, E. D.** (1988) Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of Cell Biology*, 107, 1437-1448.

- Walker, R. A., Inoué, S., Salmon, E. D.** (1989) Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro. *Journal of Cell Biology*, 108, 931–937.
- Wang, C., Li, J., Yuan, M.** (2007) Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 48, 1534-1547.
- Wang, S., Kurepa, J., Hashimoto, T., Smalle, J. A.** (2011) Salt stress-induced disassembly of *Arabidopsis* cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1. *Plant Cell*, 23, 3412-3427.
- Wang, X.** (2005) Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiology*, 139, 566–573.
- Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T., Ma, J. F.** (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *PNAS*, 107, 18381–18385.
- Zhang, W-H., Rengel Z.** (1999) Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 401–409.
- Zhang, Q., Lin, F., Mao, T., Nie, J., Yan, M., Yuan, M., Zhang, W.** (2012) Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24, 4555-4576.