

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Buněčně biologická analýza membrán v reakci rostlin
na těžké kovy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Barbora Šatná
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 5.5.2014

Poděkování

Ráda bych poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce doc. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a odborné vedení při zpracování mé práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu oddělení buněčné biologie za významnou pomoc při realizaci experimentální části této práce a jejich přátelské chování a ochotu vždy pomoci.

Chtěla bych také poděkovat svým rodičům, sestře, prarodičům a mojemu Mírovi za podporu v průběhu celého studia.

Práce byla částečně podporovaná grantem č. P501/11/1764 „Stres a signaling u rostlin pomocí mitogen-aktivovaných protein kinas: od základního výzkumu na Arabidopsis k biotechnologickým aplikacím na plodinách” z Grantové agentury České republiky (GAČR); grantem č. IGA_PřF_2014033 „Biologická a molekulární analýza vybraných MAPK při abiotických stresech” ze studentské grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci a grantem č. ED0007/01/01 z EU a České republiky pro Centrum Regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Šatná
Název práce	Buněčně biologická analýza membrán v reakci rostlin na těžké kovy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Na rostliny během jejich růstu a vývoje působí různé stresové faktory, které je mohou vážně poškodit. K tomu, aby byly rostliny schopny předejít takovému osudu, mají vyvinuté sofistikované systémy ochrany. Mezi významné komponenty signálních obranných mechanismů patří kaskády mitogen-aktivovaných protein kinas, které se podílejí na zprostředkování buněčných odpovědí na velké spektrum různých podnětů. Těžké kovy mají zásadní vliv na životní prostředí, a především rostliny se musí vyrovnat s jejich vysokými koncentracemi v půdě. Cílem diplomové práce bylo objasnění vlivu abiotických stresů, zejména vysokých koncentrací zinku, na rostliny. Metodickými přístupy buněčné biologie byly detailně charakterizovány transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* s nadprodukcí fluorescenčně-tagované solným-stresem indukované protein kinasa kinasy z *Medicago sativa*, SIMKK-YFP. Předložená práce mapuje vliv zinku na vývin a morfologii rostlin, na buněčnou redistribuci SIMKK-YFP v podmínkách stresu, na efektivitu endocytózy a na distribuci endogenní mitogen-aktivované protein kinasy 3 a mitogen-aktivované protein kinasy 6. Získané výsledky přispějí ke komplexnějšímu poznání mechanismů, kterými se rostliny brání nefyziologickým koncentracím zinku, s podílem signálních kaskád mitogen-aktivovaných protein kinas.

Klíčová slova	Stres z těžkých kovů, SIMKK, MPK3, MPK6
Počet stran	92
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Barbora Šatná
Title	Cell biology of membranes in plant reactions to heavy metal stress
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2014

Abstract

Plants are during their growth and development influenced by various stress factors that may harm them seriously. Plants developed sophisticated protection systems to prevent that. One of major components of defense signaling mechanisms in plants is represented by mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades that mediate cellular responses to a variety of different stimuli. Heavy metals represent a serious risk factor in the environment, and especially plants must compensate effects of their high concentrations in the soil. The aim of this thesis was to reveal the influence of abiotic stresses, particularly of high concentrations of zinc, on plants. By cell biological methodological approaches we characterized in detail transgenic *Arabidopsis thaliana* plants with YFP-tagged salt-stress inducible mitogen-activated protein kinase kinase from *Medicago sativa*, SIMKK-YFP. This work characterizes effects of zinc on development and morphology of experimental plants, on cell redistribution of SIMKK-YFP under stress conditions, on the efficiency of endocytosis and distribution of endogenous mitogen-activated protein kinase 3 and mitogen-activated protein kinase 6. Results will contribute to clarification of mechanisms including signaling roles of mitogen-activated protein kinase cascades, by which plants can resist non-physiological concentrations of zinc.

Keywords	Heavy metal stress, SIMKK, MPK3, MPK6
Number of pages	92
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	11
2.1 MAPK signální kaskády a její aktivace.....	11
2.1.1 MAPK, MPK.....	12
2.1.2 MAPK.....	13
2.1.3 MAPKKK.....	14
2.2 Odpovědi rostlin na abiotický stres.....	14
2.3 Stres z těžkých kovů.....	16
2.3.1 Obecný mechanismus příjmu látek.....	17
2.3.2 Hyperakumulace těžkých kovů v rostlinách.....	18
2.3.3 Detoxifikace těžkých kovů.....	19
2.4 Transport přechodných kovů.....	20
2.4.1 P _{1B} -ATPasy.....	21
2.4.2 ZIP (ZRT, IRT-like proteins) rodina.....	22
2.4.3 Nramp (Natural resistance associated macrophage protein) rodina.....	22
2.4.4 CDF (cation diffusion facilitator) rodina.....	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
3.1 Materiál a metody.....	25
3.1.1 Laboratorní přístroje.....	25
3.1.2 Mikroskopické vybavení laboratoře.....	25
3.1.3 Chemikálie.....	25
3.1.4 Rostlinný materiál.....	26
3.1.5 Metody.....	26
3.1.5.1 Povrchová sterilizace semen.....	26
3.1.5.2 Fenotypová analýza.....	27
3.1.5.3 Mikroskopické pozorování rostlin <i>Arabidopsis in vivo</i> na buněčné úrovni po působení solného stresu a stresu ze zinku.....	28
3.1.5.4 Mikroskopická detekce endocytózy a lokalizace endozomálních kompartmentů po působení zinku.....	28
3.1.5.5 Whole-mount imunolokalizace MPK3, MPK6 a mikrotubulů.....	29
3.1.5.6 Optimalizace přípravy preparátů pro light-sheet mikroskopii.....	30
4. VÝSLEDKY.....	31
4.1 Charakteristika růstových a vývojových změn rostlin testovaných linií ve stresových podmínkách.....	31
4.1.1 Vývoj rostlin v podmínkách osmotického, solného a oxidativního stresu.....	31
4.1.2 Vliv zinku na klíčivost rostlin.....	32
4.1.3 Vliv zinku na vývoj a růst rostlin.....	34
4.1.4 Vliv zinku na morfologii kořenového systému.....	35
4.1.5 Vliv zinku na formování a růst kořenových vlásků.....	36
4.1.6 Kvantitativní změny růstových parametrů kořene v odpovědi na stres vyvolaný zinkem.....	37
4.2 Distribuce SIMKK-YFP v buňkách kořene a změny v lokalizaci vyvolané abiotickými stresy.....	46
4.3 Mikroskopická dokumentace průběhu endocytózy <i>in vivo</i> v buňkách kořene transgenních linií po ovlivnění zinkem.....	52
4.4 Imunohistochemická detekce MPK3 a MPK6 v kořenových buňkách po ovlivnění vysokou koncentrací zinku.....	55

4.5 Optimalizace přípravy preparátů transgenních rostlin pro light-sheet mikroskopii.....	75
5. DISKUZE	79
6. ZÁVĚR	83
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	91

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST

Zpracování literární rešerše zabývající se problematikou odpovědí rostlinných buněk na abiotické stresy zprostředkované signálními funkcemi MAPK, zvláště se zaměřením na stres z těžkých kovů a související transport iontů těžkých kovů přes membrány u rostlin.

PRAKTICKÁ ČÁST

- 1) Optimalizace kultivačních podmínek rostlin *in vitro* pro řízenou aplikaci stresových faktorů.
- 2) Charakteristika fenotypových změn rostlin kultivovaných ve stresových podmínkách, kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení růstových parametrů kořene.
- 3) Dokumentace reakcí kořenových buněk po ovlivnění rostlin abiotickými stresy pomocí moderních fluorescenčních lokalizačních mikroskopických metod.
 - 3a) Mikroskopické studium změn dynamických procesů a dokumentace průběhu endocytózy v živých buňkách kořene po působení zvýšených koncentrací těžkých kovů.
 - 3b) Imunohistochemická detekce vybraných proteinů v kořenových buňkách rostlin po ovlivnění toxickými koncentracemi těžkých kovů.
 - 3c) Optimalizace podmínek pro využití speciální mikroskopické metody (light-sheet), která umožňuje neinvazivní studium růstu kořene experimentálních rostlin.

1. ÚVOD

Rostliny jsou sesilní organismy, neschopné úniku z nepříznivého prostředí, což vedlo k vývoji efektivních mechanismů, které slouží k rychlé adaptaci na změny environmentálních podmínek (Šamaj *et al.*, 2004). V rámci vnímání stresových signálů a odpovědí na ně, musí rostliny modifikovat a koordinovat různé fyziologické a biochemické procesy, genovou expresi, a také změny na úrovni proteinů a metabolických regulací (Thapa *et al.*, 2012). V laboratořích oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná se již několik let studuje mechanismus signalizace prostřednictvím mitogen-aktivovaných protein kinas (MAPK, MPK) v souvislosti s odpověďmi rostlin na biotický a abiotický stres. Schopnost rostlin přežít v nepříznivých (stresových) podmínkách závisí na aktivaci vzájemně propojených signálních systémů, mezi které patří MAPK kaskády, umožňující rychlé vnímání a přenos signálů z vnějšího prostředí do buňky (Colcombet a Hirt, 2008). Aktivace této dráhy ovlivňuje kromě reakcí na biotický a abiotický stres i vývojové procesy, buněčnou proliferaci a hormonální fyziologii rostlin (Nakagami *et al.*, 2005). Transdukce signálu je spouštěna aktivací receptoru stresovým podnětem na membráně buňky, následně je v rámci MAPK kaskády uvedena do činnosti první kinasa, MAPK kinasa kinasa (MAP3K, MEKK nebo MAPKKK), která aktivuje podřazenou MAPK kinasu (MAP2K, MKK nebo MAPKK), a ta následně fosforylací aktivuje poslední kinasu MAPK (Ichimura *et al.*, 2002).

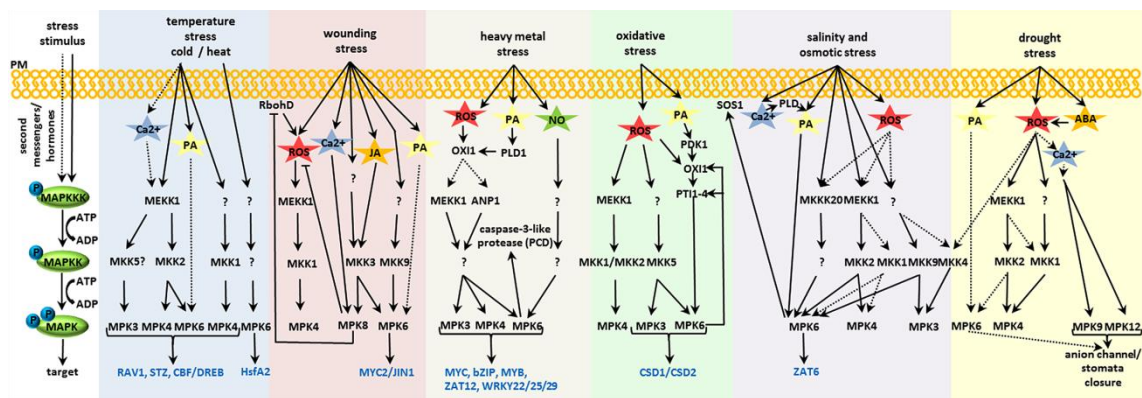
Díky antropogenním aktivitám jako jsou hornictví, spalování fosilních paliv, průmysl těžkých kovů, používání fosfátových hnojiv atd. dochází k emisi těžkých kovů a k akumulaci těchto složek v ekosystému. Ve snaze vytvořit nové strategie pro fytoremediaci a pro zvyšování tolerance rostlin vůči těžkým kovům je zapotřebí studovat a pochopit základní mechanismy, jak těžké kovy s rostlinou interagují a jaké účinky mají na buněčné, tkáňové a orgánové úrovni. Koncentrace kovových iontů musí být v rostlinném těle udržována v relativně úzkém rozsahu, aby nedošlo k intoxikaci. Udržování homeostáze kovových iontů je dosaženo kombinací různých mechanismů, mezi které patří i aktivita specifických membránových přenašečů, pump a transportérů. Tyto proteiny kontrolují transport kovových iontů přes plasmatickou membránu, tonoplast a další endomembrány (Kenderešová *et al.*, 2012). Podílejí se tím na regulaci a koordinaci rovnováhy mezi příjmem (influxem) kovů do cytoplasmy, jejich intracelulární redistribucí a výdejem (effluxem) ven ze symplastu. Doposud je známo poměrně málo o MAPK, které se podílejí v rostlinách na odpovědi na těžké kovy.

I když je známo, že MAPK kaskády se aktivují při odpovědi několika druhů rostlin na těžké kovy (Yeh *et al.*, 2004; Huang a Huang, 2008; Wang *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2013), ve výsledku máme poměrně málo informací o podílu MAPK na signalizaci tohoto typu stresu. Důsledkem dlouhodobé expozice zvýšených koncentrací kovových iontů dochází v rostlinných buňkách k zásadním změnám, jako je rozpad membrán, peroxidace lipidů, degradace DNA/RNA a eventuálně buněčná smrt (Hall, 2002). Aktivní podíl MAPK v zprostředkování těchto signálů není tudíž vůbec překvapivý.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 MAPK signální kaskády a její aktivace

Centrálním prvkem signální kaskády mitogen-aktivovaných protein kinas je sofistikovaný multienzymový komplex, který je vysoce konzervovaný u eukaryot a má důležitou roli i v adaptivních procesech u rostlin (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010). MAPK patří mezi nejlépe charakterizované rodiny signálních proteinů ve vyšších rostlinách (Šamaj *et al.*, 2004). Fosforylace je jedním z hlavních mechanismů aktivace proteinů, sloužící ke kontrole mnoha buněčných procesů u eukaryotických organismů. Rostliny mají vyvinutý komplexní signální a obranný mechanismus založený na aktivaci MAPK kaskád, který se účastní i v odpovědích na biotický a abiotický stres (Obr. 1). Aktivace MAPK kaskády vede k regulaci změn v expresi genů, ovlivňuje cytoplasmatickou infrastrukturu a funkce buňky nejen při reakci na externí stresové faktory, ale i při regulaci buněčného dělení a diferenciaci (Šamaj *et al.*, 2002). Účinnost signální dráhy je zabezpečena uspořádáním MAP3K, MAP2K a MAPK do funkčních modulů. Kinasy v rámci MAPK modulu jsou funkčně propojené a při aktivaci fosforylací i fyzicky asociované (Šamaj *et al.*, 2004). Aktivace MAPK modulu probíhá prostřednictvím reverzibilní fosforylace, což je pouze post-translační změna. Po přijetí signálu na plasmatické membráně dochází k aktivaci MAP3K. Tyto první kinasy v MAPK kaskádě jsou Ser/Thr kinasy, které fosforylují Ser/Thr zbytky v S/T-X₅-S/T motivu v aktivační smyčce MAP2K. MAP2K jsou dvojitě specifické Thr/Tyr kinasy aktivující MAPK fosforylací Tyr a Ser/Thr zbytku v T-X-Y motivu (Thr-X-Tyr, X je aminokyselina) v aktivační smyčce MAPK (Chang a Karin, 2001). Takto aktivovaná MAPK (Ser/Thr kinasa) reguluje prostřednictvím fosforylace funkci transkripčních faktorů (Ishihama a Yoshioka, 2012), cytoskeletárních proteinů (Šamajová *et al.*, 2013) a jiných protein kinas (Popescu *et al.*, 2009). V některých případech je MAPK modul rozšířen o aktivátory MAP3K známé jako MAP4K (MAPKKKK, Keshet a Seger, 2010). V genomu *Arabidopsis* bylo nalezeno celkem 20 MAPK, 10 MAP2K a 80 MAP3K (Ichimura *et al.*, 2002). Na aktivaci signálních MAPK drah se mohou podílet sekundární poslové, jako jsou ROS, Ca²⁺, NO a fosfolipidy (Xiong *et al.*, 2002), ale i hormony ABA, JA, ethylen, auxin a brasinosteroidy (Devoto a Turner, 2003), které mají důležité role v růstu, vývoji a ontogenezi rostlin.



Obr. 1 Schematické znázornění vztahů mezi MAPK kaskádami, hormony a sekundárními posly při signalizaci abiotických stresů u *Arabidopsis thaliana* (převzato z: Smékalová *et al.*, 2014).

2.1.1 MAPK, MPK

V genomu *Arabidopsis* bylo nalezeno celkem 20 MAPK. Tyto MAPK jsou děleny celkem do 4 skupin (I - IV). MAPK ze skupin I – III obsahují v aktivační smyčce motiv TEY (Thr-Glu-Tyr), ve skupině IV je to TDY (Thr-Asn-Tyr) motiv. MAPK jsou Ser/Thr kinasy, které mohou fosforylovat široké množství substrátů (Ichimura *et al.*, 2002; Hamel *et al.*, 2006).

MAPK ze skupiny I se účastní signálních drah zapojených do odpovědi na environmentální a hormonální stimuly. Do této skupiny patří mimo jiné kinasy MPK6 a MPK3 u *Arabidopsis*, SIPK (salicylic acid-induced protein kinase) a WIPK (wound-induced protein kinase) u tabáku, případně SIMK (salt-stress inducible protein kinase) a SAMK (stress-induced protein kinase) u vojtěšky (Ichimura *et al.*, 2002). AtMPK6 a AtMPK3 jsou aktivovány mnoha environmentálními stresy, např. H₂O₂, O₃, PAMP (pathogen-associated molecular patterns), osmotickým šokem, ethylenem, ABA (u MPK3) a JA (u MPK6) (Asai *et al.*, 2002; Droillard *et al.*, 2002; Teige *et al.*, 2004; Ahlfors *et al.*, 2004; Gudesblat *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2008). Tabáková WIPK má vysokou sekvenční podobnost s MPK3 u *Arabidopsis* a je aktivní v odpovědi na stres z poranění. Druhá MAPK u tabáku, SIPK, je aktivována SA a podílí se na signální transdukcii v případě biotického i abiotického stresu (Ichimura *et al.*, 2002). SAMK u vojtěšky je aktivována stresem ze sucha, poraněním, těžkými kovy a chladem (Jonak *et al.*, 2004).

II skupina MAPK je méně prostudována. MAPK z této skupiny se podílí na procesu buněčného dělení a jsou zapojeny v transdukcii signálů jak u biotického, tak i abiotického stresu. Do této skupiny patří MPK4 u *Arabidopsis*, MMK3 u vojtěšky

a Ntf6 u tabáku, které jsou lokalizovány při telofázi ve fragmoplastu (Ichimura *et al.*, 2002). Kinasa MPK4 je aktivována v případě abiotického i biotického stresu, je to regulátor odpovědi na napadení patogeny, negativně reguluje akumulaci SA, naopak pozitivně reguluje signální dráhy závislé na JA. Je také aktivována při chladovém stresu, stresu ze sucha a hyperosmotickém stresu (Ichimura *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001; Droillard *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004;).

O III skupině MAPK je v souvislosti s odpověďmi na stres v rostlinách známo jen velmi málo. Do této skupiny patří například MPK7 u *Arabidopsis* (Cheong *et al.*, 2010).

Poslední, IV skupina MAPK, je typická tím, že v porovnání s MAPK z předchozích skupin obsahuje v T-smyčce TDY motiv. MAPK této skupiny postrádají C-terminální CD doménu, kterou disponují členové jiných MAPK skupin. Do této skupiny patří MPK8, MPK9 a MPK15 u *Arabidopsis*, BWMK1 (blast/wound-induced MAP kinase 1) u rýže a TDY1 u vojtěšky (Ichimura *et al.*, 2002).

2.1.2 MAPKK

MAPKK jsou podle sekvenčního uspořádání klasifikovány do 4 skupin (A-D). Zástupci skupin C a D u *Arabidopsis* neobsahují introny (Ichimura *et al.*, 2002).

Do skupiny A patří MKK1 (dříve MEK1) a MKK2 u *Arabidopsis*, které jsou známy jako aktivátory MPK4. MKK1 je aktivována chladem, suchem, poraněním, oxidativním stresem a bakteriálními elicitory (Matsuoka *et al.*, 2002; Teige *et al.*, 2004). MKK2 přitom aktivuje i MPK6 a spouští signalizaci v odpovědích na chlad a sůl. Tato kinasa je aktivována MEKK1 (Teige *et al.*, 2004). Do skupiny B patří MKK6 a MKK3 u *Arabidopsis*, a NPK2 (nukleus/fragmoplast-localized protein kinase 2) u tabáku. AtMKK6 je zapojena v procesu cytokineze (Soyano *et al.*, 2003; Melikant *et al.*, 2004). AtMKK3 a NtNPK2 mají NTF2 doménu v C-terminální oblasti (Ichimura *et al.*, 2002). Do skupiny C patří např. SIMKK (salt-stress inducible protein kinase kinase) u vojtěšky. Tato kinasa je aktivní v přítomnosti těžkých kovů a je zapojena v ethylenové signalizaci, hyperosmotickém stresu a je aktivní v přítomnosti houbových elicitorů (Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Ouaked *et al.*, 2003; Jonak *et al.*, 2004). Podrobnější studie o MAPKK bohužel nejsou dosud k dispozici.

2.1.3 MAPKKK

MAPKKK tvoří největší skupinu v rámci zástupců MAPK kaskád. MAPKKK jsou děleny do 2 podrodin (Ichimura *et al.*, 2002): MEKK proteinové kinasy (12 u *Arabidopsis*) a Raf protein kinasy (48 u *Arabidopsis*).

Do skupiny MEKK proteinových kinas patří OMTK1 (oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1) u vojtěšky, MEKK1, ANP1/2/3 (NPK1-like protein kinase) a YODA u *Arabidopsis* a NPK1 u tabáku. MsOMTK1 je aktivována oxidativním stresem (Nakagami *et al.*, 2004). AtMEKK1 je aktivátor MKK1-2 a MKK4-5 v odpovědi rostlin na patogeny a chladový a solný stres (Mizoguchi *et al.*, 1996; Asai *et al.*, 2002; Teige *et al.*, 2004). Kinasy AtANP1/2/3 jsou aktivovány oxidativním stresem a jsou zapojeny v procesu cytokineze a v auxinové signalizaci (Kovtun *et al.*, 2000; Krysan *et al.*, 2002). AtYODA se podílí na vývoji průduchů, embryonálním založením rostlinného těla a post-embryonálním vývoji rostliny (Bergmann *et al.*, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004).

Do Raf-like proteinových kinas patří EDR1 (enhanced disease susceptibility) a CRT1 (constitutive triple reponse 1) u *Arabidopsis*, EDR1 u rýže a CTR1 u rajčete. AtCTR1 je negativní regulátor v ethylenové signalizaci (Gao *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003). EDR1 je negativní regulátor v odpovědích na patogeny (Frye *et al.*, 2001; Tang a Innes 2002).

2.2 Odpovědi rostlin na abiotický stres

Po vystavení rostlin abiotickému stresu dochází k aktivaci různých MAPK. V reakcích rostlin *Arabidopsis*, které jsou indukovány abiotickými stresy, mají významnou funkci zejména kinasy MPK3, MPK4 a MPK6. Na Obr. 1 jsou schématicky znázorněny známé složky MAPK kaskád aktivované 6 typy nejdůležitějších abiotických stresů (teplotní stres, stres z poranění, stres z těžkých kovů, oxidativní a osmotický stres, stres ze sucha), včetně aktivovaných sekundárních posílů na začátku signalizační dráhy a některých cílových proteinů na konci aktivované MAPK dráhy (Smékalová *et al.*, 2014). U většiny z nich dochází k tvorbě ROS. Tento proces (oxidativní stres) je spojen zejména s intoxikací těžkými kovy (Liu *et al.*, 2010), otravou ozónem (Miles *et al.*, 2009) a osmotickým stresem (Kim *et al.*, 2011). Např. těžké kovy způsobují narušení kontroly redoxního stavu buněk, což vede ke zvýšené hladině ROS prostřednictvím autooxidace a Fentonové reakce (tato reakce je typická pro stres vyvolaný Fe a Cu).

Tento proces ovlivňuje distribuci Ca^{2+} a aktivitu Ca^{2+} -vazebných proteinů, G-proteinů, signálních procesů, které zahrnují fosfoinositoly, a v neposlední řadě i MAPK kaskádu (Schützendübel a Polle, 2002). ROS jsou běžnými produkty aerobního metabolismu, jsou to vysoce reaktivní molekuly, které interagují s různými buněčnými komponenty, co vede k poškození důležitých makromolekul (nukleové kyseliny, proteiny, cukry, lipidy). Přispívají tím k procesům, které způsobují buněčnou smrt. K obraně proti oxidačnímu stresu mají rostliny vyvinutý rozsáhlý antioxidační systém sloužící k detoxifikaci ROS. V tomto systému jsou zahrnuty antioxidační enzymy, např. SOD (superoxid dismutasa), CAT (katalasa), APX (askorbát peroxidasa) a GR (glutathion reduktasa), jejichž přítomnost, koncentrace a aktivace určuje míru antioxidační obrany v rostlinných buňkách.

Jedním z nejčastějších stresů u rostlin je mechanické poranění. Při tomto stresu dochází k rychlé produkci rostlinných hormonů (např. JA), tvoří se ROS, nastartuje se dočasný (transientní) vtok iontů Ca^{2+} do cytoplasmy a aktivuje se fosforylace proteinů včetně aktivace MAPK kaskád (Takahashi *et al.*, 2011). Díky neustálému zvyšování globální teploty a dezertifikaci půdy dochází k poklesu vodního potenciálu. S výjimkou rostlin tolerantních na sucho, je většina suchozemských rostlin na dostupnost vody citlivá. Důležitým mechanismem, kterým se rostliny suchu brání, je uzavírání průduchů. Rostliny tím částečně dosahují snížení ztrát vody. Když je vliv sucha na rostliny dlouhodobý, dochází ke změnám v expresi genů.

Vysoké koncentrace NaCl, nebo jiných solí v půdě mají nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin. Vyvolávají solný stres. Zvyšování koncentrace solí v půdě může být způsobeno hlavně evaporací půdního roztoku, precipitací rozpustných iontů a zvětráváním hornin, přičemž se ionty solí uvolňují (Mahajan a Tuteja, 2005). Obranná reakce rostlin proti zvýšeným koncentracím solí v cytoplasmě zahrnuje aktivní odstranění Na^+ z buněk prostřednictvím antiportu Na^+ s H^+ nebo sekvestraci nadbytku iontů do vakuol, což zabezpečuje antiporter NHX1 na tonoplastu (Munns a Tester, 2008). Solný a hyperosmotický stres spouští několik signálních drah, a jsou provázány tvorbou ROS (Miller *et al.*, 2010), produkcí signálních fosfoinositolů (Bargmann *et al.*, 2009), zvýšením hladiny Ca^{2+} (Laohavisit *et al.*, 2012) a akumulací NO (Khan *et al.*, 2012).

Rostliny mírného pásu, v porovnání s rostlinnými druhy aklimatizovanými na nízké nebo vysoké teploty v jižních nebo severních částech planety, se musí vypořádat s náhlými výkyvy teplot. Důležitým důsledkem extrémních teplot je změna vlastností

plasmatické membrány. Teplo zvyšuje její fluiditu, zatímco chlad ji mění v rigidnější strukturu (Wang *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2012). Nízká teplota (chladový stres) vyvolává fyziologické odpovědi, které jsou, jako většina odpovědí na stres, v konečném důsledku vyvolány změnami v genové expresi. I v tomto typu stresu se účastní MAPK kaskády aktivace těchto genů (Mishra *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012). Přesné mechanismy zodpovědné za vnímání chladových podmínek nebyly doposud popsány. Při signální odpovědi na teplotní stres pravděpodobně dochází prvotně k mobilizaci Ca^{2+} , k aktivaci histidinkinas, k tvorbě PA a PI. Signalizační dráhy těchto sekundárních posílů aktivují jak calcium-dependentní protein kinasy, tak MAPK kaskády (Sangwan *et al.*, 2002; Delage *et al.*, 2012; Nongpiur *et al.*, 2012; Arisz *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). V reakci na tepelný stres se rostliny přednostně snaží spouštět obranné mechanismy, které zabrání dezintegraci membrán a degradaci proteinů v těchto podmínkách.

V následující kapitole teoretického úvodu se budu věnovat odpovědi rostlin na stres vyvolaný těžkými kovy.

2.3 Stres z těžkých kovů

Těžké kovy jsou definovány jako kovy, které mají hustotu vyšší než 5 g.cm^{-3} . 53 z 90 přirozeně se vyskytujících prvků jsou těžké kovy, ale ne všechny z nich jsou biologicky důležité. Pro živé organismy a ekosystémy je důležitých celkem 17 těžkých kovů. Patří mezi ně mikronutrienty Fe, Mo a Mn, stopové prvky Zn, Ni, Cu, V, Co, W a Cr, zbylé další mají neznámou funkci jako nutriety. Těžké kovy mají nekompletně zaplněný d -orbital a za fyziologických podmínek se vyskytují jako kationty. Esenciální přechodné kovy jsou důležité k aktivitě velkého počtu enzymů a proteinů, jejich koncentrace je přísně kontrolována prostřednictvím mechanismů ustanovujících jejich homeostázi. Celá řada enzymů obsahuje ve své strukturní podobě vázané kovy, a to v pozici, která je důležitá k jejich aktivitě.

Dle databáze TAIR existuje velké množství proteinů funkčně asociovaných se zinkem (1272), mědí (108), železem (106), manganem (12) a niklem (4) (Krämer *et al.*, 2007). Železo je součástí hemových proteinů jako cytochromy, Fe-S proteiny, ferredoxin a další enzymy. Měď je složkou elektronových přenašečových proteinů zapojených v procesech fotosyntézy (např. plastocyanin), respirace (např. cytochrom

c oxidasa). Zinek je redoxně neaktivní, ale má důležitou katalytickou funkci v mnoha proteinech a enzýmech (alkoholdehydrogenasa, karboxypeptidasa, DNA polymerasa).

V půdách jsou volné kovové ionty v rozsahu sub-mikromolárních až nanomolárních koncentrací. Pokud jde o jejich akumulaci, na nadbytek reagují rostliny obrannými mechanismy. Doposud je známo poměrně málo o MAPK podílejících se v rostlinách na odpovědi na těžké kovy. Je však evidentní, že MAPK signální dráhy se v případě stresu z těžkých kovů u rostlin aktivují (Yeh *et al.*, 2004; Huang a Huang, 2008; Wang *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2013). Například v semenáčcích *Medicago sativa* dochází v přítomnosti Cu a Cd k aktivaci čtyř MAPK: SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK. Kinetika těchto aktivací je však rozdílná. SIMK, nadřazená MAP2K, specificky spouští aktivaci SIMK a SAMK, avšak nepodílí se na aktivaci MMK2 a MMK3 (Jonak *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že úroveň transkripce MAPK v *A. thaliana* se zvyšuje v závislosti na čase po vystavení rostlin Cd a Cu stresu (Opdenakker *et al.*, 2012). Cd v rostlinách *Arabidopsis* způsobuje akumulaci ROS, což vede k aktivaci MPK3 a MPK6 v kořenech (Liu *et al.*, 2010). Aktivace MAPK signální dráhy vede k aktivaci několik transkripčních faktorů: MYC, bZIP (basic region-leucine zipper), MYB (myeloblastosis family of transcription factors) (Roelofs *et al.*, 2008). Transkripční faktory WRKY22, WRKY25 a WRKY29 jsou nadměrně exprimovány při krátkodobé expozici rostlin zvýšeným koncentracím Cu. V případě dlouhodobějšího působení Cd (24 h) jsou exprimovány jen poslední dva transkripční faktory. V případě transkripčního faktoru ZAT12 (zinc finger transcription factor 12) dlouhodobá expozice rostlin k Cd neovlivňuje jeho transkripci v kořenech, ale při krátkodobé expozici dochází k podobnému ovlivnění jako v případě předešlých transkripčních faktorů (Opdenakker *et al.*, 2012).

2.3.1 Obecný mechanismus příjmu látek

Různé látky z půdního roztoku jsou rostlinami přijímány buď pasivně (po směru koncentračního gradientu), nebo aktivně (proti směru koncentračního gradientu). V případě příjmu látek proti směru koncentračního gradientu je potřebné, aby byla vynaložena určitá metabolická energie. V kořenech jsou živiny transportovány prostřednictvím apoplastu nebo symplastu. Symplastický transport je založen na aktivitě bílkovinných přenašečů, které zprostředkovávají transport přes plasmatickou membránu. Mezibuněčným transportem na krátké vzdálenosti jsou v kořenu látky

dopravovány do xylému, kterým se dostávají do nadzemních částí rostlin. V listech dochází k vstupu látek do symplastu mezofylových buněk, přičemž se zde znovu uplatňují membránové transportéry. Transportní mechanizmy mohou být rozděleny do 2 hlavních skupin. První je nesespecifický transport zahrnující prostou a zprostředkovanou (pasivní) difuzi, a druhý je zprostředkovaný transport, do kterého spadá primární a sekundární aktivní transport.

Při prosté difuzi dochází k průchodu látek na základě koncentračního spádu bez spotřeby energie, je využíváno pouze kinetické energie. Molekuly jsou transportovány z místa vyšší koncentrace do místa koncentrace nižší. Tímto způsobem jsou přenášeny hlavně málo polární molekuly a plyny. Na usnadněné difuzi přes membrány se podílejí transportní molekuly. Tento pasivní přenos zprostředkovávají selektivní kanály, přes které mohou ionty volně difundovat. Látky se přes membrány pohybují ve směru koncentračního gradientu a bez spotřeby energie. Tímto typem transportu jsou přenášeny malé molekuly, ionty a voda. Aktivní transport probíhá proti koncentračnímu spádu a to buď jedním směrem, nebo může být spjat s transportem jiné látky. Dochází ke spotřebě energie ve formě ATP a přenášenými látkami jsou větší molekuly, jako cukry, aminokyseliny atd. Na transportu se podílejí přenašeče, které mají jedno, nebo více specifických vazebných míst. V aktivním transportu je zahrnutý uniport (přenášena jedna molekula), symport (přenášeny souběžně 2 různé molekuly nebo ionty stejným směrem) a antiport (přenášeny souběžně 2 rozdílné molekuly opačným směrem). Jako primární aktivní transport se označuje proces, který je spřažen s hydrolýzou ATP (např. při aktivitě Na^+/K^+ -ATPasy). Sekundární transport je spřažen s exergonickým přenosem jiné látky (např. glukosa transportovaná spolu s Na^+) (Procházka *et al.*, 1998).

2.3.2 Hyperakumulace těžkých kovů v rostlinách

Hyperakumulace kovů je fyziologický proces využívaný některými rostlinami, které jsou schopny růstu a reprodukce na půdách obsahující vysoké, potenciálně toxické hladiny přechodných kovových iontů. Ke studiím akumulace těžkých kovů v rostlinách je využíváno rostlin se schopností hyperakumulace těžkých kovů. Mezi tyto hyperakumulátory patří *Arabidopsis halleri* a *Noccaea caerulescens* (dříve *Thlaspi caerulescens*) z čeledi *Brassicaceae* (brukvovité), které jsou schopné nejen tolerovat, ale i hyperakumulovat Zn, Cd a Ni (Talke *et al.*, 2006). Hyperakumulátory jsou obecně charakterizovány tolerancí k těžkým kovům, akumulují kovy především v listech bez

symptomů toxicity a udržují nízkou koncentraci kovů v kořenech. Tyto druhy transportují těžké kovy do apoplastu a/nebo je kompartmentují a sekvestrují do vakuol (Krämer, 2010).

Různé rostlinné druhy využívají různé strategie, jak se vypořádat se zvýšenou koncentrací těžkých kovů v půdě. Rostliny můžeme rozdělit do 4 skupin: (a) druhy senzitivní na kovy (kovy jsou transportovány do výhonků a rostliny podléhají toxickým efektům kovů), (b) druhy rezistentní na kovy (jsou schopny udržet kovy mimo kořeny a v případě vstupu toxických kovů do kořenových buněk jsou schopné jejich rychlého exportu), (c) tolerující druhy, které ale kovy cíleně nehromadí (povolují vstup kovů do kořenových buněk, kovy zde jsou sekvestrovány do vakuol, čímž rostlina předchází translokaci do výhonků), (d) rostlinné hyperakumulátory (rostliny jsou na kovy tolerantní, kovy jsou přes kořeny dále rozváděny v rostlině a ve výhoncích jsou sekvestrovány do vakuol). Každá skupina má různé molekulární mechanismy, které rostlině zabezpečují toleranci/rezistenci k těžkým kovům nebo snižují negativní důsledky toxicity kovů. Obecně jsou odpovědi rostlin na těžké kovy na molekulární úrovni regulovány v procesu udržování homeostáze kovů (Lin a Aarts, 2012).

2.3.3 Detoxifikace těžkých kovů

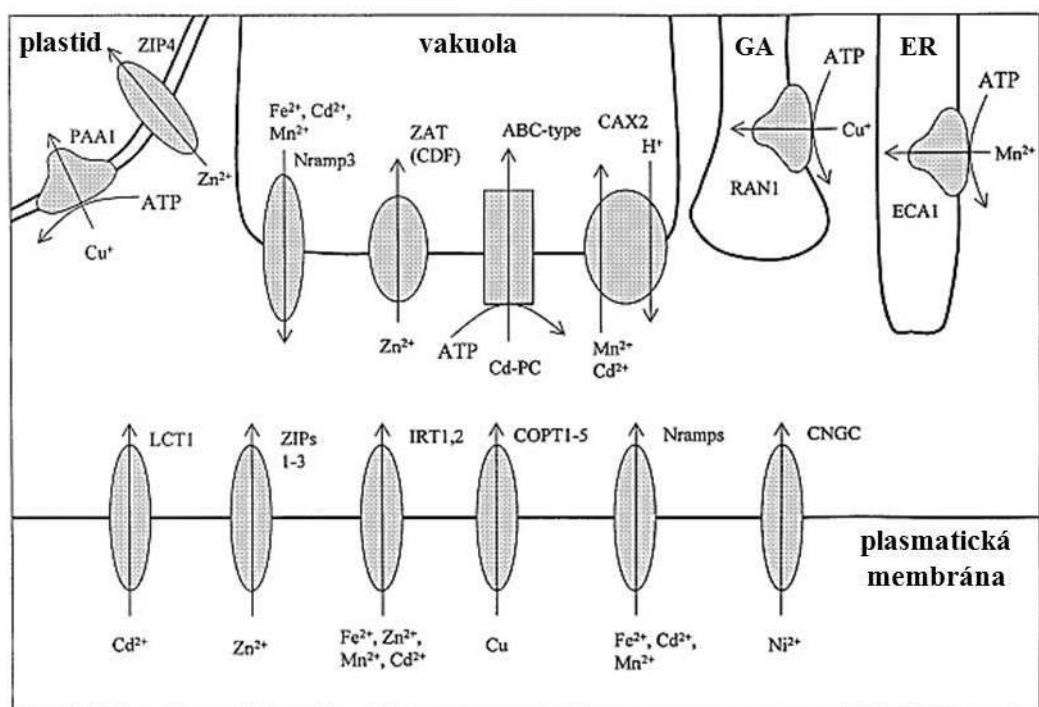
Na buněčné úrovni využívají vyšší rostliny několik mechanismů, které jim napomáhají se vypořádat se zvýšenými koncentracemi těžkých kovů. Jedná se o kontrolu vstupu kovů do buněk (influx), redukci biodostupnosti kovů, chelaci kovů, podporu vylučování (effluxu) kovů, kompartmentalizaci a sekvestraci kovů ve vakuole, detoxifikaci ROS. Významnou roli zde mají membránové transportní systémy, které jsou důležité v homeostázi a toleranci těžkých kovů (Jonak *et al.*, 2004). Schopnost regulovat toxicitu těžkých kovů kořeny rostlin závisí na elektro-fyziologických parametrech plasmatické membrány (Kenderešová *et al.*, 2012).

Kompartmentalizace kovů v buňce je nutnou a efektivní cestou k jejich separaci od aktivních buněčných metabolických sloučenin a slouží k udržení cytoplasmatické koncentrace prvků jako Zn^{2+} na tak nízké úrovni, jak je nutno. Mechanismus kompartmentalizace zahrnuje regulaci příjmu a výdeje kovů, která rozhoduje o translokaci kovových iontů buď v buňce, nebo při transportu z buňky do buňky směrem k cílové tkáni nebo orgánu a při finální sekvestraci ve vakuole, která se tak stává hlavním úložištěm k inaktivaci těžkých kovů. Sekvestrace kovů v rostlinné

vakuole může být upřednostňovaným mechanismem ochrany vůči těžkým kovům, významný podíl kovových iontů se ale může akumulovat i v buněčné stěně. Toxicita kovů na plasmatické membráně může stimulovat peroxidaci lipidů a následnou nerovnováhu iontů v cytoplasmě, způsobenou ztrátou vysoce mobilních iontů jako K^+ (Kenderešová *et al.*, 2012). Tyto poruchy funkce plasmatické membrány zahrnují nerovnováhu v příjmu a transportu iontů, způsobující změny v membránovém potenciálu (E_M) a zvyšují ztráty vody v rostlině (Chaoui *et al.*, 1997; Madhava a Stresty, 2000; Llamas *et al.*, 2008). Zn^{2+} v různých koncentracích vyvolává rychlé membránové změny, které se projevují jako primární hyperpolarizace a následná depolarizace ve zralých kořenových kortikálních buňkách. Depolarizace plasmatické membrány může být vyvolána transmembránovým pohybem různých iontů (vstupem H^+ , K^+ , Ca^{2+} a výdejem Cl^- nebo K^+) nebo jako důsledek snížení aktivity H^+ -ATPasy (Kenderešová *et al.*, 2012). V případě, že rostliny nejsou schopny se bránit vstupu iontů kovů nebo nedokážou zvýšit jejich výdej, musí nastartovat sekvestraci kovů do bezpečných míst (vakuol), které poskytují dobře kontrolovatelný skladovací prostor pro deaktivované formy kovů. Na tonoplastu vakuol se nachází několik transportérů přenášejících kovové ionty, o kterých bude pojednáno později. Rostliny jako sloučeniny chelatuující kovy využívají např. nikotinamid, glutation, fytochelatinu nebo metalothioniny.

2.4 Transport přechodných kovů

Transport kovů a jejich regulace musí být řízen s vysokou precizností a specifitou. Různé transportéry mají často odlišnou afinitu k různým těžkým kovům. Nejvyšší aktivita transportních proteinů je u tolerantních a hyperakumulátorových rostlin. Odlišné chemické vlastnosti přechodných prvků vyžadují odlišné molekulární mechanismy k jejich transportu přes membrány. Nejvýznamnější proteiny, které zprostředkovávají transport přechodných prvků v rostlině, jsou zobrazeny na Obr. 2 a budou shrnuty v následujících podkapitolách. Patří do následujících rodin: ZIP (ZRT, IRT-like protein), CDF (cation diffusion facilitator family), P_{1B} -typ superrodiny P-typu ATPas, Nramp (Natural resistance associated macrophage protein), YSL (yellow-stripe-1-like), COPT (copper transporter family), CCC1 (Ca^{2+} -sensitive cross complement 1), IREG (iron-regulated protein family), CAX (cation exchanger family), ABC (ATP-binding cassette transporters) a domnělé transportéry AtFRD3 (ferric reductase defective 3), AtZIF1 (Zinc induced facilitator 1) (Krämer, 2007).



Obr 2: Schematické znázornění membránových transportních proteinů pro těžké kovy a jejich lokalizace v různých endomembránách v buňkách rostlin (převzato: Hall a Williams, 2003). GA – Golgiho aparát, ER – endoplasmatické retikulum.

2.4.1 P_{1B}-ATPasy

Skupina P-typ ATPas je superrodina přenašečů transportujících esenciální, ale i potenciálně toxické kovy přes buněčné membrány za využití energie z hydrolýzy ATP. Tyto transportéry hrají nezastupitelnou roli v transportu esenciálních prvků a jsou zapojeny v základních buněčných procesech prostřednictvím vytváření a udržování elektrochemického gradientu. Tato superrodina je klasifikována celkem do 5 rodin (I až V), každá z nich je dělena do 2 a více podrodin podle jejich transportní specifity (Colangelo a Guerinot, 2006). Mezi ně u *Arabidopsis* patří např. P_{2B}-ATPasy (Ca²⁺-ATPasy), P_{3A}-ATPasy (H⁺-ATPasy) a P_{1B}-ATPasy (HMA-heavy metal transporter ATPasy). Podle toho, jakou mají P_{1B}-ATPasy specifitu k iontu kovu, se u *Arabidopsis* dělí na skupiny přenášející buď monovalentní (Cu⁺/Ag⁺) nebo divalentní (Zn²⁺/Co²⁺/Cd²⁺/Pb²⁺) ionty těžkých kovů. Do první skupiny patří AtHMA5, PAA1 (P-typ ATPase *Arabidopsis*), RAN1 (responsive to antagonist 1) a AtHMA8. Do skupiny transportující divalentní kovové ionty patří AtHMA1, AtHMA2, AtHMA3 a AtHMA4. P_{1B}-ATPasy mají 8 TM (transmembránových) domén, CPx motiv sloužící k translokaci iontů kovů a kov-vázající doménu na C- nebo N-konci (Axelsen a Palmgren, 2001). AtHMA2 je Zn-dependentní ATPasa, která je aktivována přítomností

Cd, méně i jinými kovy (Pb, Co, Ni, Cu) (Eren a Argüello, 2004). AtHMA4 je důležitá k translokaci Zn, Cd a Pb (Verret *et al.*, 2005). RAN1 (AtHMA7) transportuje Cu přes membránu Golgiho aparátu. Zajímavostí je, že mutace v genu *ran1-3* vedla ke konstitutivní aktivaci ethylenové signální dráhy (Woeste a Kieber, 2000). Na transportu Cu do chloroplastu se podílejí přenašeče AtHMA1, PAA1 (AtHMA6) a PAA2 (AtHMA8) (Shikanai *et al.*, 2003; Abdel-Ghany *et al.*, 2005; Seigneurin-Berny *et al.*, 2005).

2.4.2 ZIP (ZRT, IRT-like proteins) rodina

Rodina ZIP membránových přenašečů ustanovuje homeostázi iontů kovů prostřednictvím transportu kationtů (Zn, Cd, Fe, Mn) do cytoplasmy. ZIP transportéry mají 8 TM domén a smyčku bohatou na His mezi TM-3 a TM-4. Podobná oblast byla popsána i u CDF transportérů (Mäser *et al.*, 2001). U některých transportérů z této rodiny byla zaznamenána velmi vysoká úroveň exprese v podmínkách, kdy má rostlina nedostatek Zn, zatímco jejich exprese silně klesala, když byl Zn přidán do okolního prostředí (Talke *et al.*, 2006). Expese ZIP genů je v odpovědi na sníženou hladinu Zn u *Arabidopsis* pod kontrolou bZIP transkripčních faktorů, konkrétně bZIP19 a bZIP23 (Assunção *et al.*, 2010).

2.4.3 Nramp (Natural resistance associated macrophage protein) rodina

Nramp je rodina vysoce konzervovaných integrálních membránových proteinů nacházejících se v plasmatické membráně, která slouží k transportu širokého množství kovových iontů u mnoha organismů včetně bakterií, hub, rostlin a živočichů. Doposud bylo funkčně charakterizováno jen málo Nramp proteinů. V kvasinkách byly identifikovány proteiny SMF 1-3, které transportují Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} a Fe^{2+} (Liu *et al.*, 1997; Supek *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999). Rostlinné Nramp se dělí do 2 podrodin: první podrodina zahrnuje AtNramp1, AtNramp6 a OsNramp1, OsNramp 3, a druhá podrodina zahrnuje AtNramp2-5 a OsNramp2 (Curie *et al.*, 2000).

Nramp1 funguje u *Arabidopsis* jako transportér Mn ve fyziologických podmínkách, je lokalizovaný na plasmatické membráně buněk (Cailliatte *et al.*, 2010) a mimo zmíněný transport Mn se podílí i na přenosu Fe. V případě AtNramp2 nebyla zjištěna zvýšená exprese nebo regulace proteinu v odpovědi na zvýšené koncentrace Fe (Curie *et al.*, 2000). AtNramp3 transportuje Fe z vakuol u *Arabidopsis* (Thomine *et al.* 2000,

Thomine *et al.*, 2003). Stejně jako AtNramp3 se i AtNramp4 nachází na tonoplastu a podílí na akumulaci Fe ve vakuole (Lanquar *et al.*, 2005). AtNramp6 je intracelulární transportér kovů, který se výrazně podílí na distribuci a na snižování dostupnosti volných iontů Cd v buňce (Cailliate *et al.*, 2009).

2.4.4 CDF (cation diffusion facilitator) rodina

Členové rodiny CDF se podílejí na příjmu a na výdeji těžkých kovů. Jsou lokalizováni na plasmatické membráně a v membránách různých buněčných organel. Přenos kovových iontů prostřednictvím těchto transportérů je zprostředkován proti koncentračnímu gradientu s využitím iontů H^+ nebo K^+ . Celkem je CDF dělena do 3 skupin podle jejich substrátové specifity. Jsou to skupiny transportující Zn (I), Zn a Fe (II) a Mn (III). Zástupci každé ze skupin dokáží transportovat i další přechodné prvky, ovšem s různou mírou specifity. Např. Zn transportéry jsou vysoce specifické pro Zn, ale transportují i Co, Cd a Ni. V rostlinných buňkách se CDF nazývají MTP (metal tolerance protein, Montanini *et al.*, 2007). CDF proteiny mají 6 TM domén s N-terminálními sekvencemi a C-terminální doménu vázající kationty. Eukaryotické buňky obsahují CDF proteiny s doménou bohatou na His, která se nachází na cytoplasmatické straně v oblasti mezi TM-4 a TM-5 (Paulsen a Saier, 1997).

Několik CDF transportérů bylo identifikováno i u kvasinek. U *Schizosaccharomyces pombe* byl nalezen gen pro ZHF (zinc homeostasis factor). Tento protein je lokalizován na membráně endoplasmatického retikula (Clemens *et al.*, 2002). *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje na tonoplastu transportéry ZRC1 (zinc resistance conferring 1) a COT1 (cobalt toxicity 1) podílející se na vakuolární akumulaci iontů Zn a Cd (Blaudez *et al.*, 2003). U rostlin jsou transportéry této rodiny intenzivně studovány. Hyperakumulátorový druh *Thlaspi caerulescens* obsahuje transportéry ZTP1 (zinc tolerance protein 1) a ZTP2. Geny pro tyto transportéry jsou exprimovány především v kořenech, gen *ZIP1* se exprimuje i v listech. U nehyperakumulátorového druhu *Thlaspi arvense* dochází k expresi genů pro tyto transportéry výhradně v podmínkách limitních koncentrací Zn. Zvýšená exprese *ZTP1* se vyskytuje v kalamínových půdách, tj. půdách bohatých na Zn, Cd a Pd. Naopak v půdách bohatých na Ni je *ZTP1* exprimován mnohem méně (Assunção *et al.*, 2001). U *Arabidopsis* bylo popsáno celkem 12 transportérů MTP. Jako první byl charakterizovaný gen *ZAT* (později přejmenován na AtMTP1), který se exprimuje ve všech orgánech rostliny. Transportér

je lokalizovaný na tonoplastu a jeho aktivace vede ke zvýšené akumulaci Zn v kořenech (van der Zaal *et al.*, 1999). Podobný transportér byl nalezen i u *Oryza sativa*, který mimo Zn transportuje i Co, Fe, Cd, ovšem s nižší afinitou (Menguer *et al.*, 2013). U *Arabidopsis* byly dále popsány funkce i jiných transportérů této rodiny, např. MTP3, který transportuje Zn přes tonoplast (Arrivault *et al.*, 2006), nebo MTP11, který transportuje Mn (Delhaize *et al.*, 2007).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Laboratorní přístroje

Laboratorní předvážky S1502, BEL (Itálie); analytické váhy XA110/2X, Radwag (Polsko); pH metr Cyberscan 310, Eurotech Instruments (Singapur); laminární box, Biohazard (Itálie); vortex, Labnet (USA); Image Scanner III, Epson (Japonsko), výkyvná třepačka MR-12, Biosan (Lotyšsko); elektromagnetická míchačka MSH-420, Boeco (Německo); membránová vývěva, Vacuubrand (Německo); třepačka s nastavitelnou teplotou inkubace ES-20, Biosan (Lotyšsko); fytotronová komora, Weiss Gallenkamp (Německo).

3.1.2 Mikroskopické vybavení laboratoře

- binokulární lupa M165FC, Leica (Německo) s CCD kamerou, Leica Microsystem (Německo).
- konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710, Zeiss (Německo).
- light-sheet fluorescenční mikroskop 7.1, Zeiss (Německo).

Veškeré mikroskopy jsou řízeny analytickými programy Zeiss built-in Zen 2012 Blue a Black software. Pro analýzu obrazu byl také využit volně dostupný program Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

3.1.3 Chemikálie

Desert Biological: Meicelasa

Duchefa Biochemie: Murashige & Skoog medium (MO221.0050)

Invitrogen: Alexa Fluor 488 sekundární protilátka (goat anti rat), Alexa Fluor 546 sekundární protilátka (goat anti rabbit), N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(8-(4-(diethylamino)fenyl)hexytrienyl)pyridinium dibromid (FM4-64)

Sigma Aldrich: 4',6-diamin-2-fenylindol (DAPI), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄·2H₂O), hydroxid draselný (KOH), heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄·7H₂O), chlorid draselný (KCl), dimethylsulfoxid (DMSO), piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová

	kyselina) (PIPES), ethylenglykol- <i>bis</i> -(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina (EGTA), glycerol, glutaraldehyd, heptahydrát síranu zinečnatého (ZnSO ₄ .7 H ₂ O), hovězí sérový albumin (BSA), hydroxid sodný (NaOH), hypochlorid sodný (NaClO), chlorid sodný (NaCl), primární protilátka anti-MPK3 (rabbit), primární protilátka anti-MPK6 (rabbit), Nonidet P-40, paraformaldehyd, phytigel, sacharosa, tetrahydroboritan sodný (NaBH ₄), Tween ²⁰ , parafenylendiamin.
<u>Serotec:</u>	Primární protilátka anti- α -tubulin (rat)
<u>Serva:</u>	Celulasa, macerosym, Toluidinová modř O
<u>Zeiss:</u>	Imerzní olej 518F

3.1.4 Rostlinný materiál

- divoký typ *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0).
- rostliny *Arabidopsis thaliana* stabilně exprimující chimérický gen pro cytoplasmatický fúzní protein sGFP (Mano *et al.*, 1999). Rostliny jsou dále v textu označeny jako pMAT-GFP.
- rostliny *Arabidopsis thaliana* stabilně exprimující GFP protein (Ovečka *et al.*, 2014). Rostliny jsou dále v textu označeny jako GFP5.
- rostliny *Arabidopsis thaliana* stabilně exprimující SIMKK protein fúzovaný s YFP proteinem (C-terminální fúze) – rostliny jsou dále v textu označeny jako samotné linie SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11, u kterých byla zjištěna rozdílná úroveň exprese transgenů (Ovečka *et al.*, 2014).

3.1.5 Metody

3.1.5.1 Povrchová sterilizace semen

Sterilizační roztok: 1% hypochlorid sodný ve sterilní dH₂O, 0,05% Tween²⁰

½ MS médium (navážky uvedeny na 1 l média připraveného v dH₂O): 10 g sacharosy, 6 g phytagelu (pro pevné médium, pro tekuté médium se phytigel nepřidává), 4,3 g MO221.0050; pH=5,8, upraveno pomocí 0,1 mol.l⁻¹ a 1 mol.l⁻¹ KOH.

Semena rostlin byla přenesena do čisté Eppendorf zkumavky (poměr semen ku sterilizačnímu médiu by neměl přesáhnout 1:50). Semena byla promyta 1ml 70% ethanolu, po 2 min byl ethanol odpipetován. Byl přidán 1 ml sterilizačního roztoku, po 8 min byl roztok odpipetován a následně byla semena 3 x 5 min promyta sterilní dH₂O. Při každém kroku byly semena pravidelně protřepávány. Sterilní semena byla pipetou přenesena na ½ MS médium bez vitamínů. Práce byla prováděna ve sterilních podmínkách. Petriho misky s vysetými semeny byly inkubovány 2 d ve vodorovné poloze při 4°C. Po chladové stratifikaci byly misky se semeny přeneseny do fytotronu, kde byly kultivovány při standartních podmínkách (22°C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h).

3.1.5.2 Fenotypová analýza

K analýze fenotypu rostlin byla využita semena divokého typu *A. thaliana* Col-0 a transgenních linií pMAT-GFP, GFP5, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11. Petriho misky byly po sterilizaci a stabilizaci při 4°C postaveny buď do vertikální polohy ve směru růstu kořene, nebo do vodorovné polohy, a ve fytotronu kultivovány při konstantních podmínkách (22°C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). V případě stresu z těžkých kovů byl jako indikátor stresu přidán do ½ MS média bez vitamínů ZnSO₄·7H₂O v koncentracích 200 μmol.l⁻¹, 500 μmol.l⁻¹, 1 mmol.l⁻¹ a 5 mmol.l⁻¹.

Při mikroskopické analýze, pozorování růstu kořene a tvorby bočních kořenů byly semenáčky 2 d po jejich vyklíčení s ohledem na to, aby nedošlo k jejich poškození, přeloženy na ½ MS média s Zn²⁺ a dále kultivovány ve fytotronu při konstantních podmínkách (22°C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). Byla sledována rychlost růstu kořene a tvorba bočních kořenů všech linií. Pro vyhodnocení růstu kořene rostlin byly rostliny na Petriho miskách skenovány v průběhu 5 d v programu EPSON Scan a růst kořene byl kvantitativně vyhodnocen v programu ImageJ. K fenotypovému studiu semenáčků ovlivněných Zn²⁺ byla využita binokulární lupa. K vyhodnocení analýzy rozptylu (ANOVA) byl využit Fisherův LSD test (STATISTICA 12), prostřednictvím kterého byly zjištěny statisticky významné rozdíly při hladinách významnosti P<0,05 při měření délky kořenů a bočních kořenů jednotlivých linií a variant experimentu.

K analýze klíčivosti semenáčků byla sterilní semena přenesena na ½ MS médium bez vitamínů nebo ½ MS médium bez vitamínů obsahující Zn²⁺ v koncentracích 200 μmol.l⁻¹, 500 μmol.l⁻¹, 1 mmol.l⁻¹ a 5 mmol.l⁻¹. Po stabilizaci byly Petriho misky

kultivovány ve fytotronu ve vodorovné poloze při konstantních podmínkách (22°C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). Klíčivost byla počítána s využitím binokulární lupy po dobu 3 d vždy přesně po 24 h a kvantitativně vyhodnocena.

Pro barvení kořenového systému semenáčků toluidonovou modří byla sterilní semena přenesena na ½ MS médium bez vitamínů nebo ½ MS médium bez vitamínů s 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} . 9 d po vyklíčení ve vodorovné poloze byly rostliny barveny v roztoku toluidinové modří (1% roztok (w/v) v PBS) po dobu 30 min. Reakce byla zastavena přenesením semenáčků z toluidinové modří do ½ MS tekutého média a následně byly semenáčky fotografovány.

3.1.5.3 Mikroskopické pozorování rostlin *Arabidopsis in vivo* na buněčné úrovni po působení solného stresu a stresu ze zinku

2 d staré semenáčky transgenních linií GFP5, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 byly po dobu 24 h stabilizovány v mikroskopické komůrce (Ovečka *et al.*, 2005) v ½ MS tekutém médiu bez vitamínů (kontrolní podmínky), ½ MS tekutém médiu bez vitamínů s 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} nebo ½ MS tekutém médiu bez vitamínů s 250 mmol.l^{-1} NaCl. Poté byly rostliny buď přímo mikroskopovány, nebo byly perfuzí promyty 5 mmol.l^{-1} Zn^{2+} (v případě stabilizace v 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}) nebo 500 mmol.l^{-1} NaCl (v případě stabilizace v 250 mmol.l^{-1} NaCl). Semenáčky byly mikroskopovány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Zeiss LSM 710 při nastavených parametrech pro detekci GFP s excitací při 488 nm v emisním spektru 493-579 nm, a pro detekci YFP s excitací při 514 nm v emisním spektru 519-621 nm.

3.1.5.4 Mikroskopická detekce endocytózy a lokalizace endozomálních kompartmentů po působení zinku

Ke sledování endocytózy a endozomálních kompartmentů bylo využito barvení s FM4-64. 2 d od vyklíčení byly semenáčky transgenních linií GFP5, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 nejprve stabilizovány v ½ MS tekutém médiu bez vitamínů nebo ½ MS tekutém médiu bez vitamínů s 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} . Poté byl perfuzí na rostlinné preparáty postupně aplikován objem 100 μl (10 $\mu\text{l}/10\text{min}$) roztoku FM4-64 (ředěno s ½ MS tekutým médiem bez vitamínů v poměru 1:400, konečná koncentrace 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Semenáčky byly mikroskopovány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Zeiss LSM 710 při nastavených parametrech pro simultánní detekci GFP a FM4-64 s

excitací při 488 nm v emisním spektru 493-579 nm pro GFP a 622-759 nm pro FM4-64. Pro simultánní detekci YFP a FM4-64 byla použita excitace při 514 nm a detekce byla snímána v emisním spektru 519-590 nm pro YFP a 637-759 nm pro FM4-64.

3.1.5.5 Whole-mount imunolokalizace MPK3, MPK6 a mikrotubulů

PBS (v dH₂O): 0,14 mol.l⁻¹ NaCl, 2,7 mmol.l⁻¹ KCl, 6,5 mmol.l⁻¹ Na₂HPO₄.2H₂O, 1,5 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄, pH=7,3 upraveno pomocí 0,1 mol.l⁻¹ a 1 mol.l⁻¹ KOH.

MTSB (v dH₂O): 50 mmol.l⁻¹ PIPES, 5 mmol.l⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 5 mmol.l⁻¹ EGTA, pH=6,9.

EGTA (0,5 mol.l⁻¹ zásobní roztok): 3,8 g EGTA doplnit do 20 ml dH₂O; pH=8,0 pomocí peciček KOH

Fixační roztok: 1.5 % (v/v) paraformaldehyd, 0,5 % (v/v) glutaraldehyd v ½ MTSB; pH=7,4

Redukční roztok: 0,1 % (v/v) NaBH₄ v 1x PBS (vždy musí být připraven čerstvě)

Permeabilizační roztok: 10% (v/v) DMSO, 2% (v/v) Nonidet P-40 v 1x PBS.

DAPI (zásobní roztok): 10 mmol.l⁻¹ DAPI v DMSO.

Mounting médium: 9,2 mmol.l⁻¹ parafenylendiamin, 0,66 % (v/v) DMSO, 10 % (v/v) 1x PBS, 90 % (v/v) glycerol.

Enzymový koktejl: 1 % (v/v) meicelasa, 2 % (v/v) celulasa, 1 % (v/v) macerosym v 1x PBS.

Blokovací roztok: 3 % (v/v) BSA v 1x PBS.

Semena divokého typu *A. thaliana* Col-0 a transgenních linií SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 byla po sterilizaci a stabilizaci kultivována ve vertikální poloze ve fytotronu za konstantních podmínek (22°C, vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). Po 3 d od vyklíčení semenáčků bylo aplikováno po dobu 30 min 10 ml ½ MS tekutého média (bez phytagelu), ½ MS tekutého média s 5 mmol.l⁻¹ ZnSO₄.7H₂O a nebo byly semenáčky odebrány přímo z Petriho misek do fixačního roztoku. Semenáčky byly za využití vakua zafixovány ve fixačním roztoku po dobu 1 h (pokojová teplota), následně byly rostliny promyty 10 min v ½ MTSB a 2 x 10min v PBS. K redukci aldehydových skupin bylo

použito redukčního roztoku (15 min, pokojová teplota) a následně byly semenáčky promyty 3 x 5 min v PBS. Působením enzymového koktejlu byla rozrušena buněčná stěna (30 min, 37°C), poté byly semenáčky 2 x 10 min promyty v PBS a 1 h při pokojové teplotě inkubovány v permeabilizačním roztoku. Následně byly rostliny 4 x 10 min promyty v PBS a 1 h blokovány v blokovacím roztoku při pokojové teplotě. Poté byly semenáčky inkubovány s primárními protilátkami rozředěnými v 3% BSA v PBS při 4°C přes noc. Byly použity následující protilátky: anti- α -tubulin (ředění 1:350), anti-MPK3 (ředění 1:350) a anti-MPK6 (ředění 1:750). Semenáčky byly 6 x po 10 min promyty PBS s 3% BSA a následně inkubovány se sekundární protilátkou rozředěnou v 3% BSA (ředění: Alexa Fluor 488 1:500, Alexa Fluor 546 1:500) v PBS po dobu 1,5 h při 37°C a další 1,5 h při pokojové teplotě. Jádra semenáčků byla obarvena DAPI roztokem (ředěno 1:1000) při pokojové teplotě po dobu 15 min. Nakonec byly rostliny přeneseny na podložní sklíčka s montovacím médiem a zakryty krycími sklíčky a uzavřeny lakem na nehty. Vzorky byly mikroskopovány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Zeiss LSM 710 při nastavených parametrech pro detekci DAPI s excitací při 405 nm v emisním spektru 410-495 nm, pro detekci komplexů mikrotubulů (MT) s protilátkou Alexa Fluor 488 s excitací při 488 nm v emisním spektru 494-552 nm a pro detekci komplexů MAPK s protilátkou Alexa Fluor 546 s excitací při 561 nm v emisním spektru 566-680 nm.

3.1.5.6 Optimalizace přípravy preparátů pro light-sheet mikroskopii

Semena transgenních linií SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 byla vysazena na ½ MS médium bez vitamínů. 2 d po vyklíčení s ohledem na to, aby nedošlo k jejich poškození, byly semenáčky vpraveny pomocí pístu do malých kapilárek. Takto připravené preparáty byly instalovány do mikroskopu a snímány pomocí osvětlení light-sheet v ½ MS tekutém médiu po dobu 60-120 min při excitaci 514 nm a s detekcí v emisním spektru pro YFP.

4. VÝSLEDKY

4.1 Charakteristika růstových a vývojových změn rostlin testovaných linií ve stresových podmínkách

4.1.1 Vývoj rostlin v podmínkách osmotického, solného a oxidativního stresu

Vliv různých abiotických stresů na růst a celkovou morfologii rostlin byl testován na rostlinách *A. thaliana* ekotypu Col-0 a na transgenních liniích SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11. Rostliny klíčící 2 d na kontrolním ½ MS médiu byly přeneseny na ½ MS média s obsahem 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ paraquatu k indukci oxidativního stresu, s obsahem 200 mmol.l^{-1} sorbitolu k indukci osmotického stresu a s obsahem 100 mmol.l^{-1} NaCl k indukci solného a osmotického stresu.

Rostliny vykazovaly 14 DPP (dní po přeložení) signifikantní znaky inhibice růstu a vývinu, typické pro jednotlivé typy stresů. Porovnání rostlin všech linií v kontrolních podmínkách neodhalilo zásadní změny ve vývoji kořenového systému, nebo nadzemní části, i když nadzemní část linie SIMKK-YFP#4 nevyprodukovala takovou biomasu, jako linie SIMKK-YFP#11, nebo Col-0 (Obr. 3). Oxidativní stres indukoval masivní inhibici růstu kořenů v míře, která byla porovnatelná u všech testovaných linií (Obr. 3). Vývoj nadzemní části u všech linií byl tímto typem stresu inhibován v porovnání s osmotickým a solným stresem výrazně méně (Obr. 3). Délka kořenů všech porovnávaných linií divokého typu Col-0 i transgenních linií SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 byla značně redukována přítomností 200 mmol.l^{-1} sorbitolu, nebo 100 mmol.l^{-1} NaCl v kultivačním médiu v porovnání s kontrolním médiem (Obr. 3). Celková délka hlavního kořene i postranních kořenů byla výrazně potlačena přítomností těchto stresových faktorů.

Z celkového fenotypu rostlin je zřetelný rozdíl v tom, jak rostliny reagují na osmotický a solný stres. Přítomnost vysoké koncentrace sorbitolu v kultivačním médiu vedla k tvorbě kořenového systému s efektivnějším prodlužováním postranních kořenů, které ale rostly v těsné blízkosti hlavního kořene (Obr. 3). Na médiu s obsahem NaCl bylo typické prorůstání postranních kořenů do stran zachováno (Obr. 3). Zajímavé bylo i porovnání nadzemních částí rostlin, u kterých byl vývoj silněji ovlivněn solným stresem než osmotickým stresem (Obr. 3). Výsledky experimentu ukazují, že růst primárních kořenů při osmotickém a solném stresu byl u transgenních linií exprimujících SIMKK-YFP méně redukován než u kontrolních rostlin (Obr. 3).



Obr. 3 Kvalitativní porovnání růstu a vývoje rostlin Col-0, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 pod vlivem osmotického, oxidativního a solného stresu. Rostliny 14 DPP na kontrolním médiu a médiu s obsahem $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ paraquatu, 200 mmol.l^{-1} sorbitolu a 100 mmol.l^{-1} NaCl. Měřítko 4 cm.

4.1.2 Vliv zinku na klíčivost rostlin

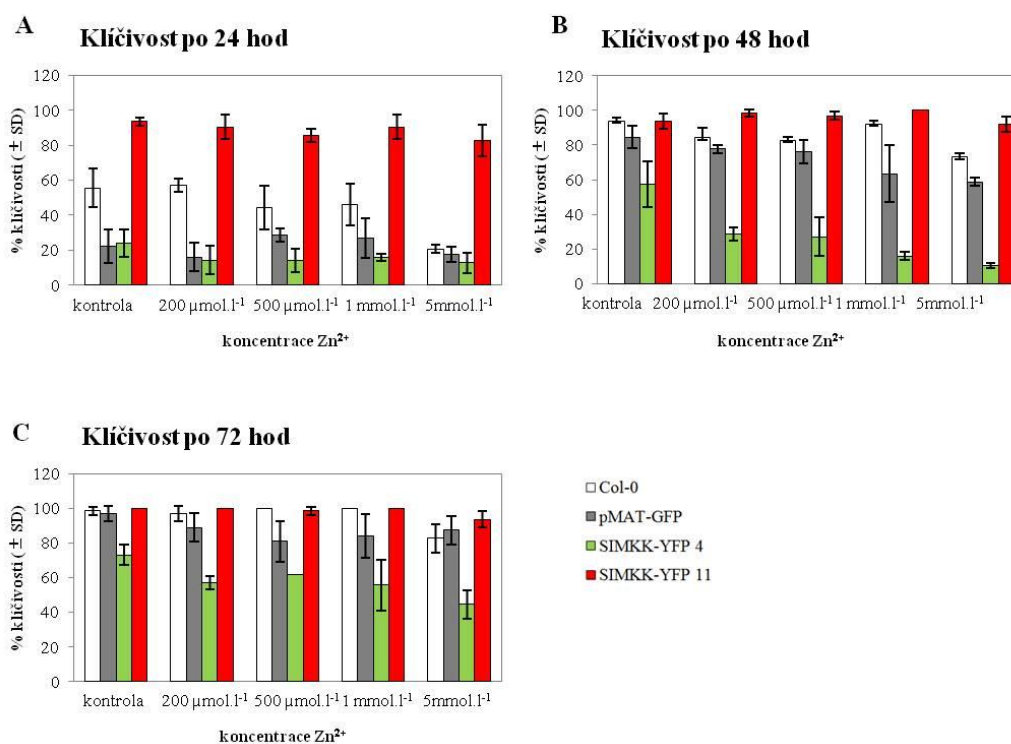
Možné efekty zvýšených koncentrací Zn^{2+} na klíčení rostlin byly testovány na Col-0, na kontrolní transgenní linii s expresí pMAT-GFP a na transgenních liniích s expresí SIMKK-YFP (linie SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11). Semena byla vysazena na kontrolní $\frac{1}{2}$ MS médium a na $\frac{1}{2}$ MS média obsahující $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 mmol.l^{-1} a 5 mmol.l^{-1} Zn^{2+} . Klíčení semen bylo kvantitativně vyhodnoceno v 24 h intervalech v průběhu 3 d.

Po 24 h tohoto testu bylo pozorováno, že nejvyšší frekvenci klíčení dosahovala linie SIMKK-YFP#11, a to jak v kontrolních podmínkách, tak i po ovlivnění Zn^{2+} . U Col-0 vykazovaly hodnoty klíčivosti přibližně stejné výsledky na kontrolním médiu a na médiu s obsahem $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} , docházelo ale ke značnému snížení klíčivosti na médiu s obsahem 5 mmol.l^{-1} Zn^{2+} . Klíčivost semen Col-0 na médiích s obsahem $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a 1 mmol.l^{-1} Zn^{2+} byla snížena přibližně o 10%. Linie SIMKK-YFP#4

klíčila nejpomaleji a v porovnání s kontrolními podmínkami se klíčivost ještě snižovala na médiích se zvýšenými koncentracemi Zn^{2+} (Obr. 4A).

Po 48 h byly rozdíly v klíčivosti testovaných linií při různých koncentracích Zn^{2+} stále patrné. Koncentrace $5\text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ snižovala klíčivost všech linií. Nejvíce rezistentní na tuto koncentraci byla SIMKK-YFP#11, naopak nejméně, a to se značným rozdílem, linie SIMKK-YFP#4. Tendence nízké klíčivosti a též pomalejšího klíčení u této linie byla pozorována ve všech případech. Zvyšující se koncentrace Zn^{2+} klíčivost linie pMAT-GFP postupně snižovala, co bylo pozorováno i u Col-0. Rozdíl mezi těmito dvěma liniemi byl pozorován při nejvyšších použitých koncentracích ($1\text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ a $5\text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$), přičemž Col-0 byla více rezistentní k těmto koncentracím než pMAT-GFP (Obr. 4B).

Po 72 h vyklíčila téměř všechna semena u Col-0 a SIMKK-YFP#11 v kontrolních podmínkách a téměř na všech koncentracích Zn^{2+} , mimo nejvyšší testovanou koncentraci ($5\text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$). U pMAT-GFP se počet vyklíčených semen snižoval na médiích s $500\text{ }\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$ a $1\text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$. Linie SIMKK-YFP#4 byla v kontrolních podmínkách vyklíčena přibližně na 75% a na médiích se zvyšující se koncentrací Zn^{2+} se její schopnost klíčit postupně snižovala (Obr. 4C).



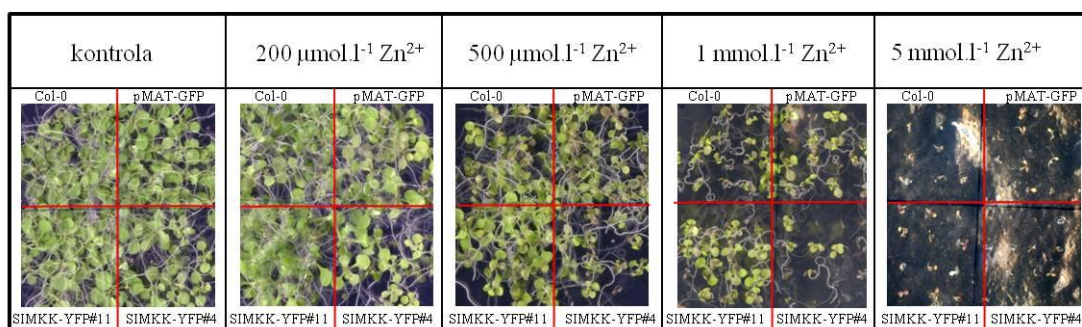
Obr. 4 Kvantitativní vyhodnocení klíčivosti semen linií Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 na médiích s různým obsahem Zn^{2+} po 24h (A), 48h (B) a 72h (C). Data reprezentují průměr \pm SD z 3 samostatných biologických opakování.

4.1.3 Vliv zinku na vývoj a růst rostlin

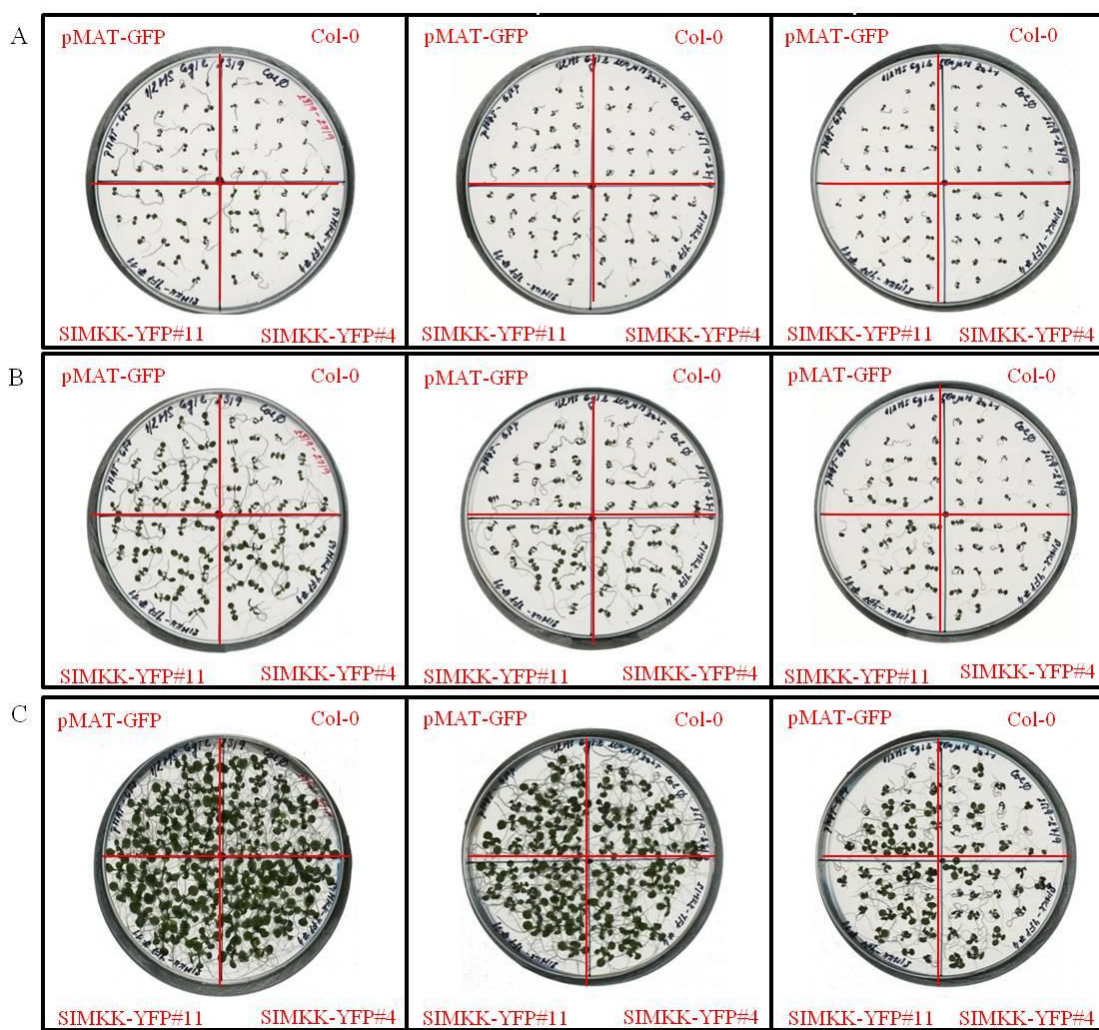
Ovlivnění růstu a vývoje rostlin různými koncentracemi Zn^{2+} bylo studováno na rostlinách divokého typu Col-0 a transgenních liniích pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11. Rostliny klíčili na kontrolním $\frac{1}{2}$ MS médiu a na $\frac{1}{2}$ MS médiích s obsahem $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 mmol.l^{-1} a 5 mmol.l^{-1} Zn^{2+} .

V přítomnosti zvyšujících se koncentrací Zn^{2+} docházelo k postupnému snižování růstu kořene i nadzemní části rostlin (Obr. 5). Vysoké koncentrace Zn^{2+} mají zásadní vliv na celkový růst a vývoj rostlin. Už při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} došlo k viditelnému úbytku biomasy všech linií. Koncentrace 1 mmol.l^{-1} Zn^{2+} značně inhibovala celkový růst rostlin, ale do takové míry, kdy byly rostliny ještě schopné růstu. V přítomnosti maximální koncentrace Zn^{2+} (5 mmol.l^{-1}) se růstová aktivita rostlin zastavila již po vyklíčení semenáčků (Obr. 5).

Nejvyšší odolnost ke zvýšeným koncentracím Zn^{2+} vykazovali transgenní linie pMAT-GFP a SIMKK-YFP#11. Rozdíl v nárůstě biomasy na médiích s $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a 1 mmol.l^{-1} Zn^{2+} 11 d po vyklíčení rostlin je průkazný mezi transgenními liniemi SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 (Obr. 5). U růstu na $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} bylo pozorováno, že růst rostlin v přítomnosti této koncentrace nebyl nijak omezen při porovnání s kontrolou. Tato skutečnost ovšem nebyla patrná při počátečních pozorováních. V raných fázích vývoje a růstu rostlin (Obr. 4), byl inhibiční efekt Zn^{2+} pozorován na médiu s $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$, výrazněji pak na médiu s $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, především po 7 d kultivace (Obr. 6). V této fázi vývoje bylo možné pozorovat rezistentnější růst linií pMAT-GFP a SIMKK-YFP#11 (Obr. 6C). Druhý den po vyklíčení rostlin bylo zřetelné, že transgenní linie SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 jsou v této fáze růstu odolnější vůči Zn^{2+} stresu (Obr. 6B).



Obr. 5 Porovnání průběhu růstu rostlin Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 na médiích s obsahem vyznačených koncentrací Zn^{2+} 11 dnů po vyklíčení.

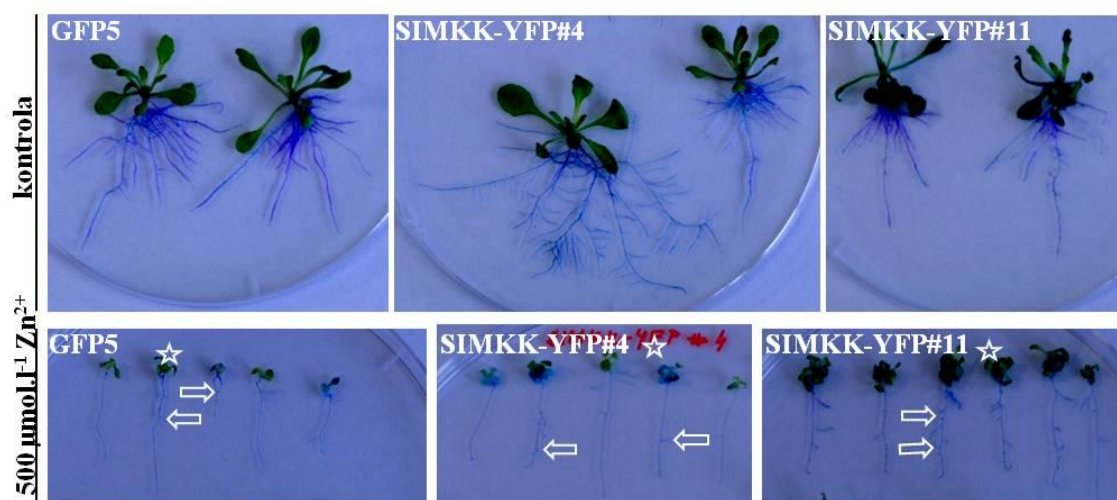


Obr. 6 Dokumentace růstu semenáčků rostlin Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 na médiích s obsahem vyznačených koncentrací Zn^{2+} 2 d po vyklíčení (A), 4 d po vyklíčení (B) a 7 d po vyklíčení (C). Měřítka 4,5 cm.

4.1.4 Vliv zinku na morfologii kořenového systému

Větvení primárního kořene a morfologie kořenového systému byly charakterizovány na 9 d starých rostlinách linií GFP5, SIMKK-YFP#4, SIMKK-YFP#11. Rostliny rostoucí ve vodorovné poloze na kontrolním $\frac{1}{2}$ MS médiu a na $\frac{1}{2}$ MS médiu s $500 \mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$ byly barveny v roztoku toluidinové modři a fotograficky dokumentovány (Obr. 7). Rostliny linií GFP5 a SIMKK-YFP#4 měly v kontrolních podmínkách lépe vyvinuté postranní kořeny, které v některých případech dokonce přesahovaly délku primárního kořene. Rostliny linie SIMKK-YFP#11 měli vyvinutý jednodušší kořenový systém s dominantním primárním kořenem (Obr. 7). Naopak, v podmínkách zvýšené koncentrace Zn^{2+} ($500 \mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$) byl u rostlin SIMKK-YFP#11 pozorován větší

počet bočních kořenů v porovnání s rostlinami linií SIMKK-YFP#4 a GFP5. Rostliny této linie měli také lépe vyvinutou nadzemní část rostliny (Obr. 7).



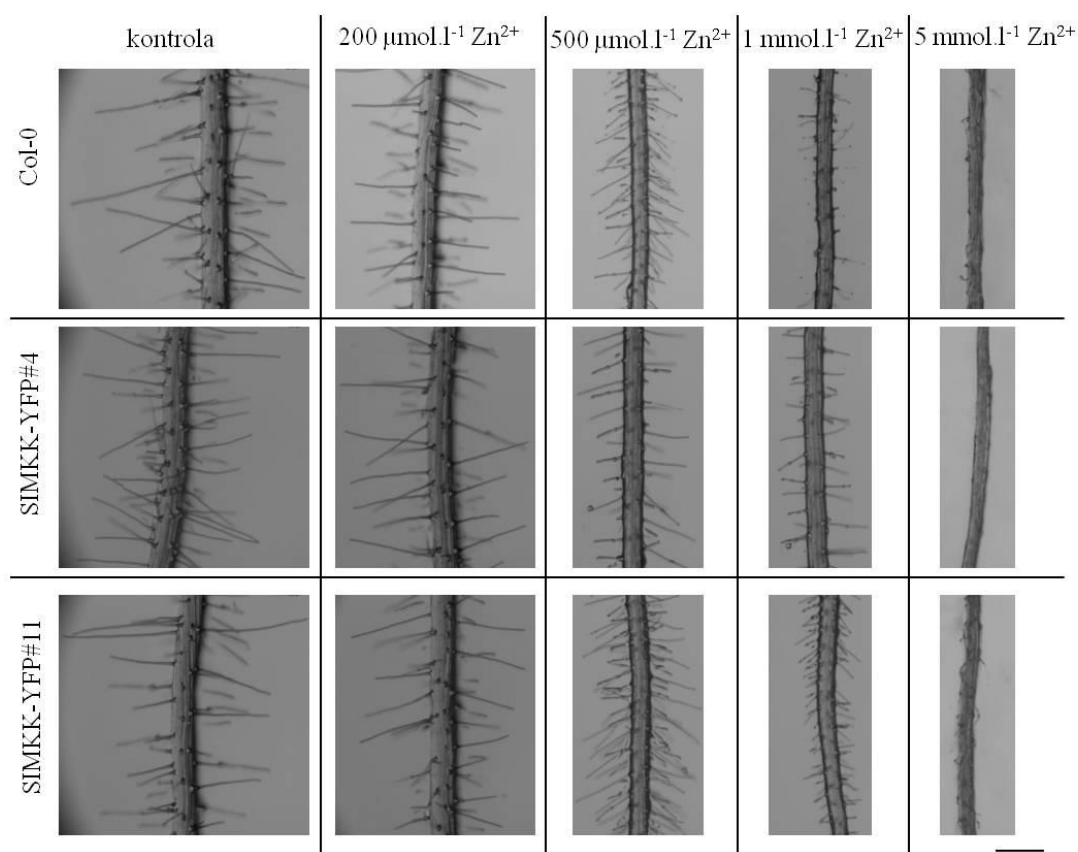
Obr. 7 Morfologie kořenového systému rostlin GFP5, SIMKK-YFP#4, SIMKK-YFP#11 v kontrolních podmínkách a po ovlivnění Zn^{2+} . Délka primárního kořene a tvorba bočních kořenů byla zásadním způsobem ovlivněna Zn^{2+} . Na médiu s obsahem Zn^{2+} jsou boční kořeny označeny šipkou a nadzemní části jsou označeny hvězdičkou. Kořeny rostlin 9 d starých byly barveny toluidinovou modří.

4.1.5 Vliv zinku na formování a růst kořenových vlásků

Detailnější analýzy rostlin ovlivněných Zn^{2+} zahrnovali i vývojovou charakteristiku kořenových vlásků, které mají význam pro rozšíření sorpční plochy kořene, při příjmu vody a iontů. Formují se v diferenační zóně kořene a jsou velmi citlivé na jakékoliv chemické, nebo mechanické změny v okolí kořene. Analýza byla provedena s rostlinami Col-0, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11, které rostly nejprve na kontrolním $\frac{1}{2}$ MS médiu a 2 d po vyklíčení byly přeložena na $\frac{1}{2}$ MS média obsahující 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 mmol.l^{-1} a 5 mmol.l^{-1} Zn^{2+} . Pro vyloučení možných vlivů mechanického stresu při experimentu byly přeloženy i kontrolní rostliny. Kořenové vlásky, jejich výskyt a morfologie po ovlivnění škálou koncentrací Zn^{2+} byly dokumentovány pomocí binokulární lupy (Obr. 8).

Koncentrace 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} neměla v porovnání s kontrolou zásadní vliv na formování a růst kořenových vlásků. U rostlin ovlivněných vyššími koncentracemi Zn^{2+} (500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 1 mmol.l^{-1} Zn^{2+}) byl růst kořenových vlásků redukován, což vedlo k tomu, že byly podstatně kratší než u kontroly. Na médiu s 1 mmol.l^{-1} Zn^{2+} bylo možné pozorovat rozdíl v citlivosti porovnávaných linií, protože redukce formování a růstu

kořenových vlásků byla u linií s expresí SIMKK-YFP výrazně nižší. Vysoká koncentrace Zn^{2+} (5 mmol.l^{-1}) zásadně redukovala formování a růst kořenových vlásků, takže v přítomnosti této vysoké koncentrace Zn^{2+} kořen vlásky vůbec nevytvářel (Obr. 8).



Obr. 8 Mikroskopická dokumentace formování a růstu kořenových vlásků v diferencované části kořene linií Col-0, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 na médiích s obsahem $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 mmol.l^{-1} a 5 mmol.l^{-1} Zn^{2+} . Zvyšování koncentrace Zn^{2+} v kultivačním médiu vedlo k postupnému snižování růstu kořenových vlásků, až k úplnému zastavení jejich tvorby. Měřítka $200 \mu\text{m}$.

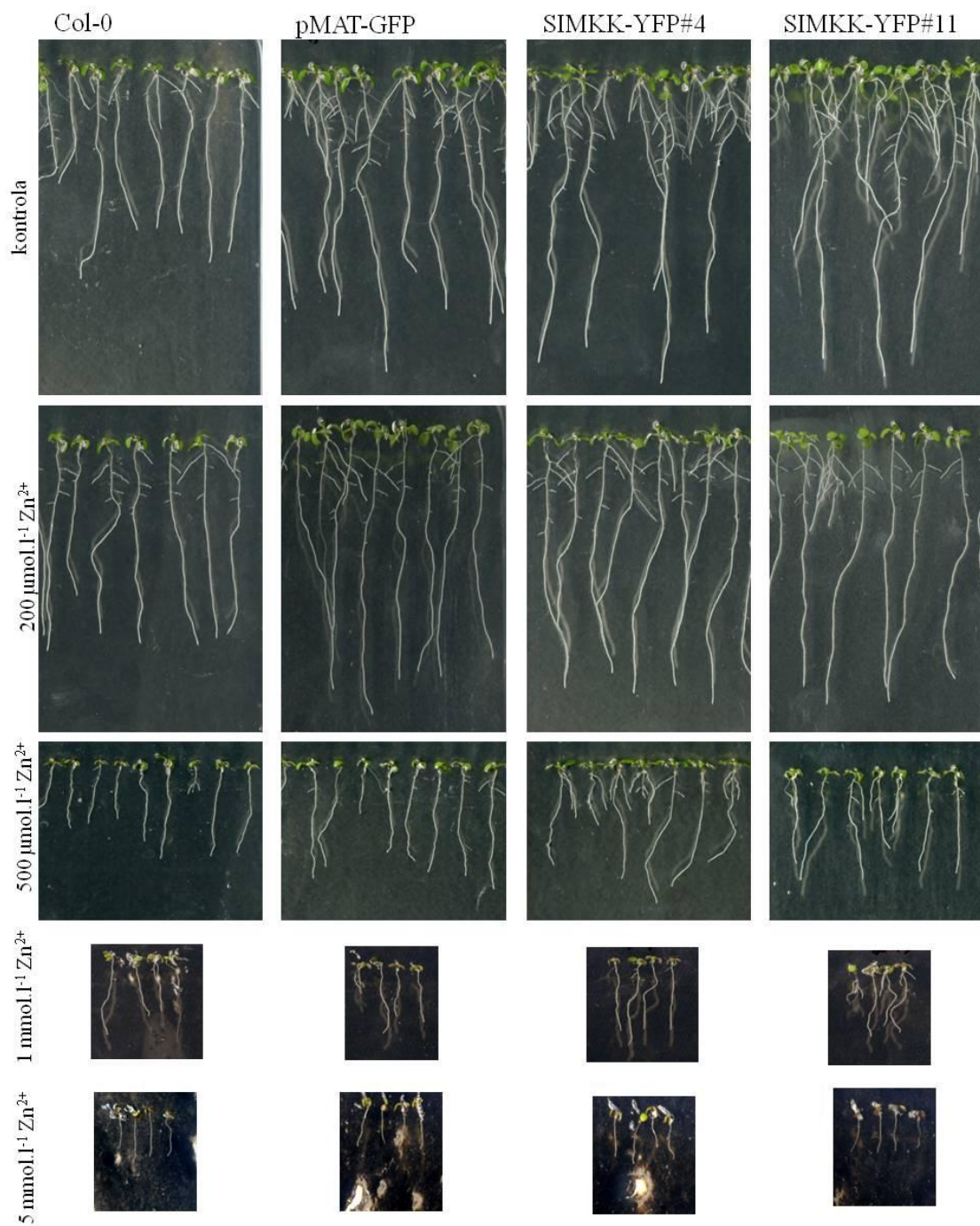
4.1.6 Kvantitativní změny růstových parametrů kořene v odpovědi na stres vyvolaný zinkem

Kvantitativní hodnocení parametrů (celková délka primárního kořene a počet bočních kořenů) bylo provedeno na rostlinách Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11. Semenáčky 2 d po vyklíčení na kontrolním $\frac{1}{2}$ MS médiu byly přeloženy na kontrolní $\frac{1}{2}$ MS médium, nebo na $\frac{1}{2}$ MS média obsahující $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 mmol.l^{-1} a 5 mmol.l^{-1} Zn^{2+} . Rostliny byly pravidelně skenovány v průběhu 5 d a následně byla vyhodnocena rychlost růstu primárního kořene a počet bočních kořenů. Celková délka kořene byla měřena v programu ImageJ. K vyhodnocení

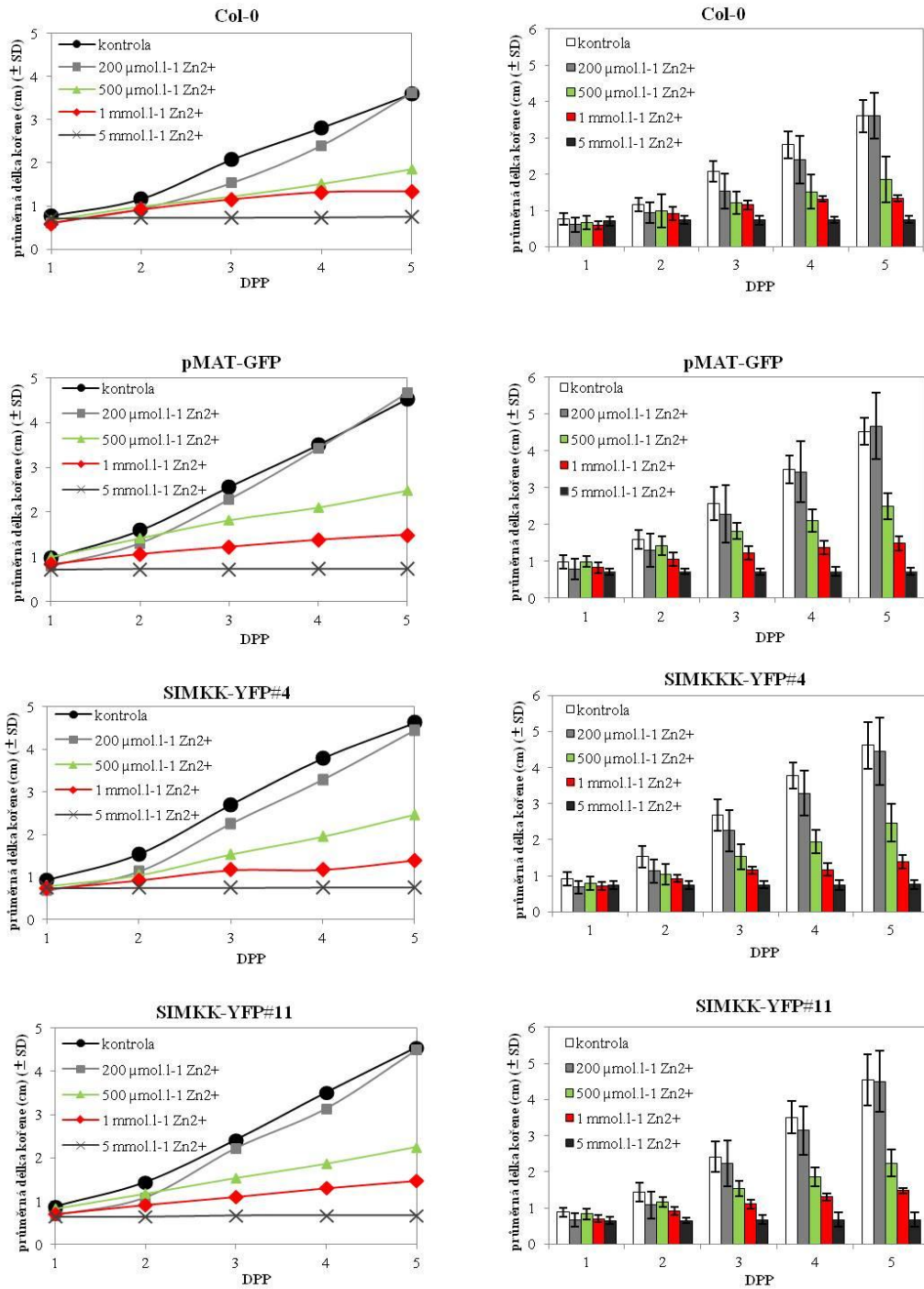
byl použit statistický test analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Fisherovým LSD testem.

Zvyšující se koncentrace Zn^{2+} v kultivačním médiu měly zásadní vliv na celkovou délku kořenů rostlin všech linií (Obr. 9). Při koncentraci $1 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ bylo pozorováno značné ovlivnění růstu primárního kořene a po působení koncentrace $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ bylo dokonce pozorováno úplné zastavení růstu kořenů (Obr. 9, 10, 11). Koncentrace $200 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$ měla zpočátku inhibiční vliv na růst kořenů, v průběhu experimentu (5 d) docházelo ale k postupné adaptaci rostlin na tyto stresové podmínky (Obr. 10). Transgenní linie s expresí SIMKK-YFP rostly v kontrolních podmínkách rychleji a výsledky naznačili, že byly rezistentnější ke zvýšeným koncentracím Zn^{2+} (Obr. 11). Tento fakt byl ovšem statisticky potvrzen jen u nejvyšší koncentrace Zn^{2+} (Tab. 2). Na hladině významnosti $P < 0,05$ se prokázal tento fakt u linie SIMKK-YFP#11. Statisticky významné rozdíly byly potvrzeny i mezi liniemi Col-0 a SIMKK-YFP#4 a mezi liniemi pMAT-GFP a SIMKK-YFP#4 (Tab. 2). Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány mezi kontrolní variantou a koncentrací $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$, mezi $200 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$ a $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (u všech linií), a mezi kontrolou a $1 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ u všech transgenních linií (Tab. 1).

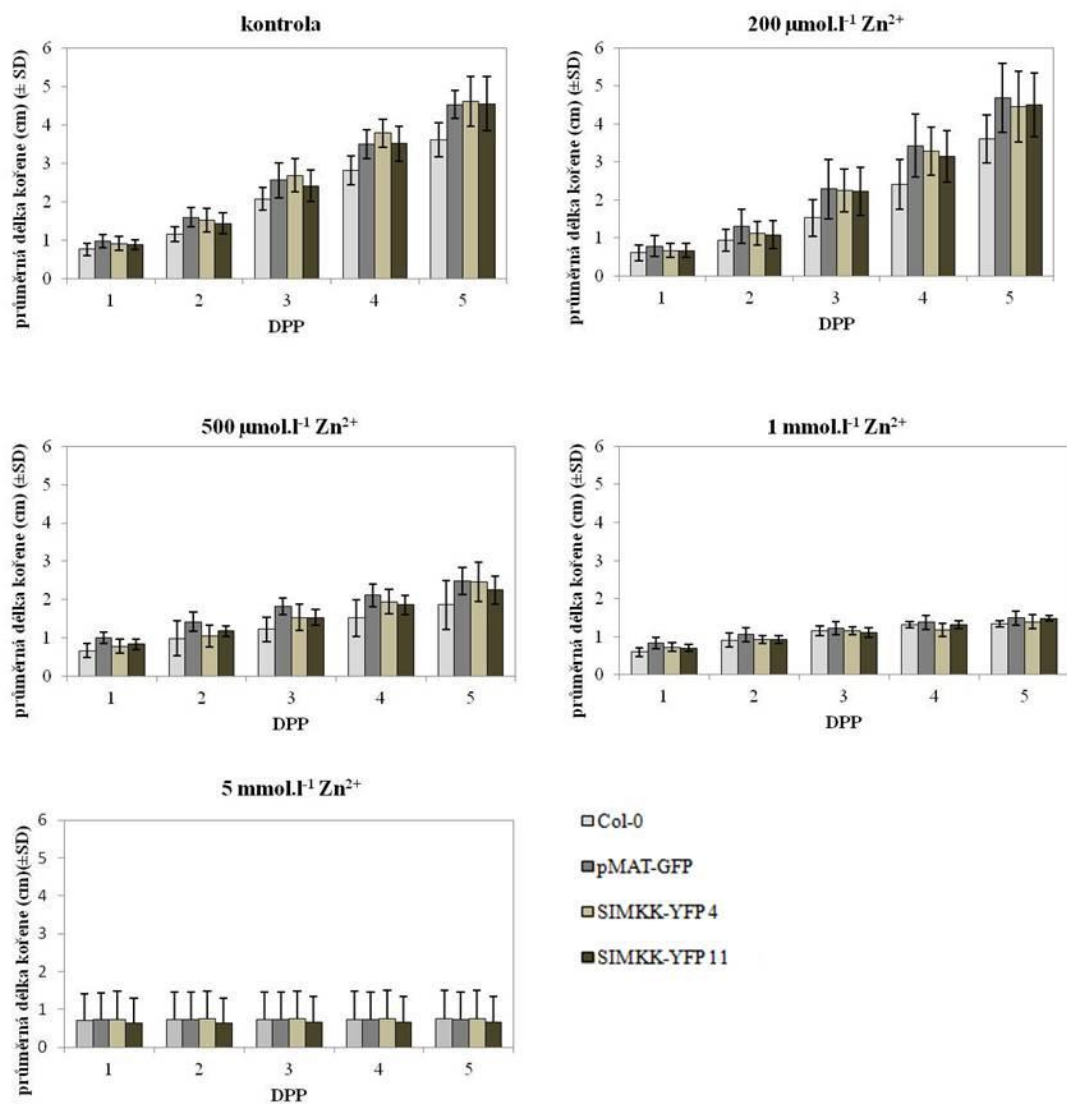
Tvorba bočních kořenů byla ovlivněna zvýšenými koncentracemi Zn^{2+} , jejich počet se zvyšoval v závislosti na zvyšující se koncentraci Zn^{2+} (Obr. 12). U rostlin ovlivněných $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ nedocházelo v průběhu pozorování k tvorbě bočních kořenů. Po ovlivnění koncentrací $1 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ nejvíce bočních kořenů tvořily linie s expresí SIMKK-YFP (Obr. 13), u kterých byl náznak, že budou obecně v tvorbě bočních kořenů po působení Zn^{2+} efektivnější. Na hladině statistické významnosti $P < 0,05$ se ale tento předpoklad nepotvrdil (Tab. 4). V kontrolních podmínkách se nejvíce bočních kořenů tvořilo u rostlin linie pMAT-GFP. Statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $P < 0,05$ při srovnání různých koncentrací Zn^{2+} a u jednotlivých testovaných linií však shledány nebyly (Tab. 3).



Obr. 9 Morfologie rostlin Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 4 d po přeložení rostlin na média kontrolní a obsahující 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 mmol.l^{-1} a 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+} . Měřítko 2 cm.



Obr. 10 Kvantitativní porovnání délky primárního kořene rostlin Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 po 5 d kultivaci na médiích se zvyšující se koncentrací Zn²⁺. DPP, den po přeložení rostlin. Data reprezentují průměr \pm SD z 3 nezávislých biologických opakování.



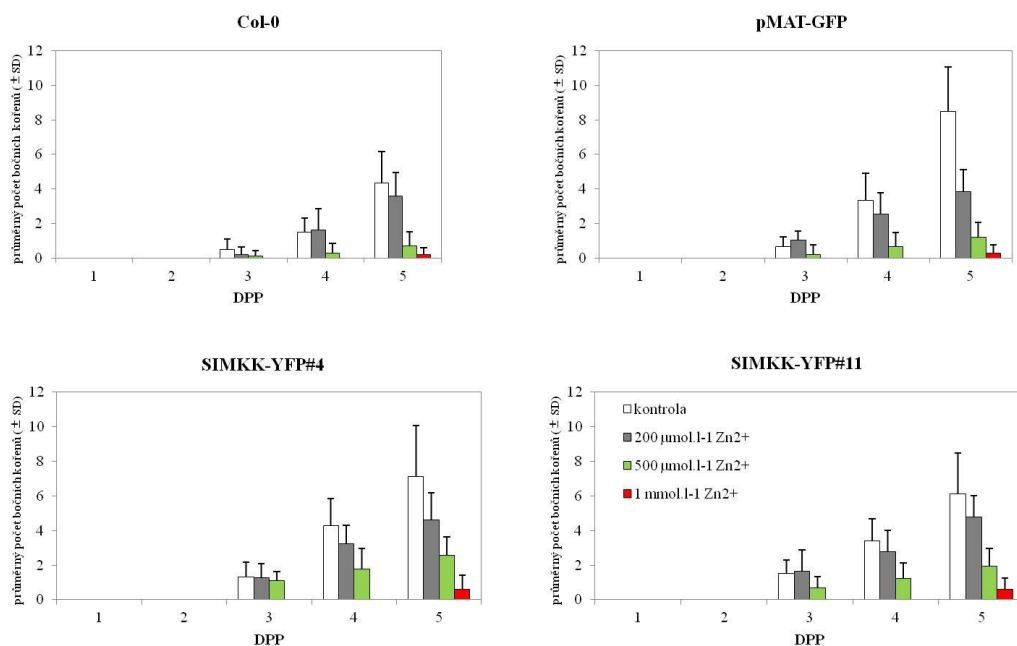
Obr. 11 Kvantitativní porovnání délky primárního kořene rostlin Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 po 5 d kultivaci na médiích se zvyšující se koncentrací Zn²⁺. DPP, den po přeložení rostlin. Data reprezentují průměr ± SD z 3 nezávislých biologických opakování.

Tab. 1 Fisherův LSD test pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů v délce primárních kořenů u jednotlivých linií po ovlivnění Zn^{2+} . Analýza rozptylu porovnání různých koncentrací u jednotlivých linií. Červeně jsou označeny rozdílné hodnoty s hladinou významnosti $P < 0,05$.

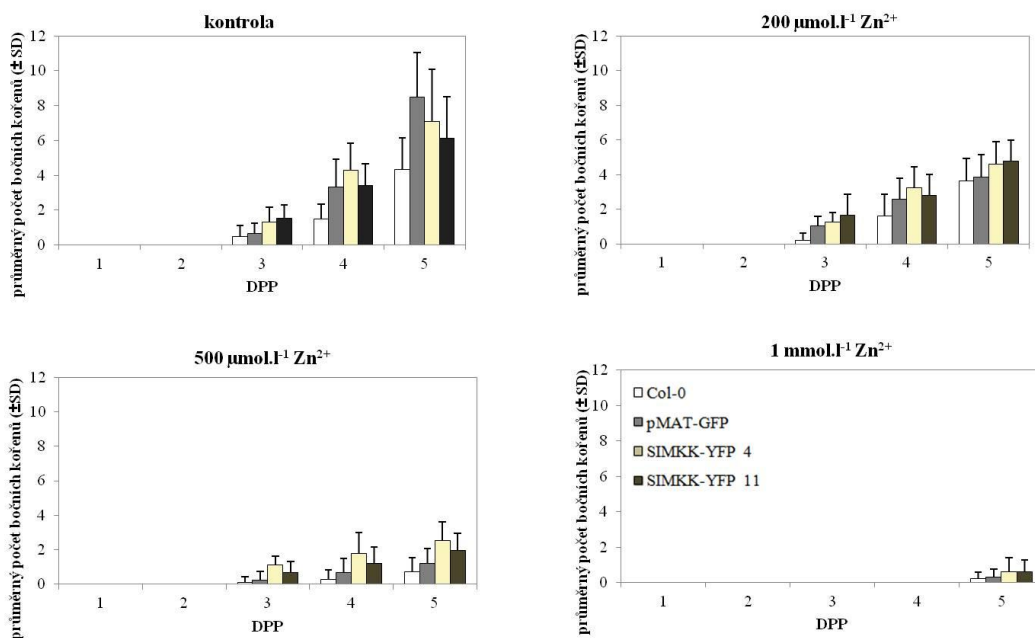
	kontrola	200 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	1 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	5 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$
Col-0					
kontrola		0,60060	0,10949	0,05405	0,01359
200 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,60060		0,26650	0,14547	0,04186
500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,10949	0,26650		0,71402	0,31477
1 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,05405	0,14547	0,71402		0,51711
5 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,01359	0,04186	0,31477	0,51711	
pMAT-GFP					
kontrola		0,83281	0,18319	0,03318	0,00653
200 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,83281		0,25777	0,05122	0,01054
500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,18319	0,25777		0,37418	0,11320
1 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,03318	0,05122	0,37418		0,46339
5 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,00653	0,01054	0,11320	0,46339	
SIMKK-YFP#4					
kontrola		0,59667	0,09027	0,01854	0,00672
200 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,59667		0,22851	0,05637	0,02193
500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,09027	0,22851		0,44267	0,22838
1 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,01854	0,05637	0,44267		0,6509
5 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,006724	0,02193	0,22838	0,65090	
SIMKK-YFP#11					
kontrola		0,71494	0,12081	0,03292	0,00737
200 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,71500		0,22576	0,06909	0,01671
500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,12081	0,22575		0,50980	0,18851
1 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,03292	0,06909	0,50980		0,49793
5 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$	0,00737	0,01671	0,18851	0,49793	

Tab. 2 Fisherův LSD test pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů v délce primárních kořenů u jednotlivých linií po ovlivnění Zn^{2+} . Analýza rozptylu porovnání jednotlivých linií při různých koncentracích Zn^{2+} . Červeně jsou označeny rozdílné hodnoty s hladinou významnosti $P < 0,05$.

	Col-0	pMAT-GFP	SIMKK-YFP#4	SIMKK-YFP#11
kontrola				
Col-0		0,54884	0,49722	0,60186
pMAT-GFP	0,54884		0,93355	0,93708
SIMKK-YFP#4	0,49722	0,93355		0,87301
SIMKK-YFP#11	0,60186	0,93708	0,87301	
200 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$				
Col-0		0,47949	0,57407	0,59699
pMAT-GFP	0,47949		0,88246	0,85587
SIMKK-YFP#4	0,57407	0,88246		0,97302
SIMKK-YFP#11	0,59699	0,85587	0,97302	
500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$				
Col-0		0,17296	0,41459	0,44926
pMAT-GFP	0,17296		0,56419	0,52442
SIMKK-YFP#4	0,41459	0,56419		0,95138
SIMKK-YFP#11	0,44926	0,52442	0,95138	
1 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$				
Col-0		0,45686	0,99291	0,81856
pMAT-GFP	0,45686		0,40206	0,60387
SIMKK-YFP#4	0,92291	0,40206		0,74455
SIMKK-YFP#11	0,81856	0,60387	0,74455	
5 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$				
Col-0		0,32475	0,03002	0,00000
pMAT-GFP	0,32475		0,00368	0,00000
SIMKK-YFP#4	0,03002	0,00368		0,00000
SIMKK-YFP#11	0,00000	0,00000	0,00000	



Obr. 12 Kvantitativní porovnání počtu bočních kořenů u rostlin Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 po 5 d kultivaci na médiích se zvyšující se koncentrací Zn²⁺. Nejvíce bočních kořenů se tvořilo v kontrolních podmínkách, nejméně po ovlivnění 1 mmol.l⁻¹ Zn²⁺. Po ovlivnění 5 mmol.l⁻¹ Zn²⁺ se boční kořeny netvořili. DPP, den po přeložení rostlin. Data reprezentují průměr ± SD z 3 nezávislých biologických opakování.



Obr. 13 Kvantitativní porovnání počtu bočních kořenů u rostlin Col-0, pMAT-GFP, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 po 5 d kultivaci na médiích se zvyšující se koncentrací Zn²⁺. Nejvíce bočních kořenů v kontrolních podmínkách se formovalo u linie pMAT-GFP, nejméně u Col-0. DPP, den po přeložení rostlin. Data reprezentují průměr ± SD z 3 nezávislých biologických opakování.

Tab. 3 Fisherův LSD test pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů ve formování bočních kořenů u jednotlivých linií po ovlivnění Zn^{2+} . Analýza rozptylu jednotlivých linií při různých koncentracích Zn^{2+} při hladinách významnosti $P < 0,05$.

	kontrola	200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	1 mmol.l^{-1} Zn^{2+}
Col-0				
kontrola		0,81573	0,19055	0,12816
200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,81573		0,27513	0,19034
500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,19055	0,27513		0,81522
1 mmol.l^{-1} Zn^{2+}	0,12816	0,19034	0,81522	
pMAT-GFP				
kontrola		0,43907	0,12214	0,07328
200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,43907		0,41397	0,27778
500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,12214	0,41397		0,77943
1 mmol.l^{-1} Zn^{2+}	0,07326	0,27778	0,77943	
SIMKK-YFP#4				
kontrola		0,56283	0,25246	0,06549
200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,56283		0,55931	0,18461
500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,25246	0,55931		0,44098
1 mmol.l^{-1} Zn^{2+}	0,06549	0,18461	0,440978	
SIMKK-YFP#11				
kontrola		0,73725	0,19840	0,06996
200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,73725		0,33202	0,12902
500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Zn^{2+}	0,19840	0,33202		0,55676
1 mmol.l^{-1} Zn^{2+}	0,6996	0,12902	0,55676	

Tab. 4 Fisherův LSD test pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů ve formování bočních kořenů po ovlivnění Zn^{2+} . Analýza rozptylu různých koncentrací Zn^{2+} u jednotlivých linií při hladinách významnosti $P < 0,05$.

	Col-0	pMAT-GFP	SIMKK-YFP#4	SIMKK-YFP#11
kontrola				
Col-0		0,50733	0,49056	0,60998
pMAT-GFP	0,50733		0,97846	0,87649
SIMKK-YFP#4	0,49056	0,97846		0,85528
SIMKK-YFP#11	0,60998	0,87649	0,85528	
200 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$				
Col-0		0,73513	0,53685	0,52474
pMAT-GFP	0,73513		0,77788	0,76354
SIMKK-YFP#4	0,53685	0,77788		0,98498
SIMKK-YFP#11	0,52474	0,76354	0,98498	
500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$				
Col-0		0,68282	0,08978	0,27395
pMAT-GFP	0,68282		0,18363	0,48387
SIMKK-YFP#4	0,08978	0,18363		0,51053
SIMKK-YFP#11	0,27395	0,48387	0,51053	
1 $\text{mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$				
Col-0		0,88001	0,54812	0,54812
pMAT-GFP	0,88001		0,65158	0,65158
SIMKK-YFP#4	0,54812	0,65158		1
SIMKK-YFP#11	0,54812	0,65158	1	

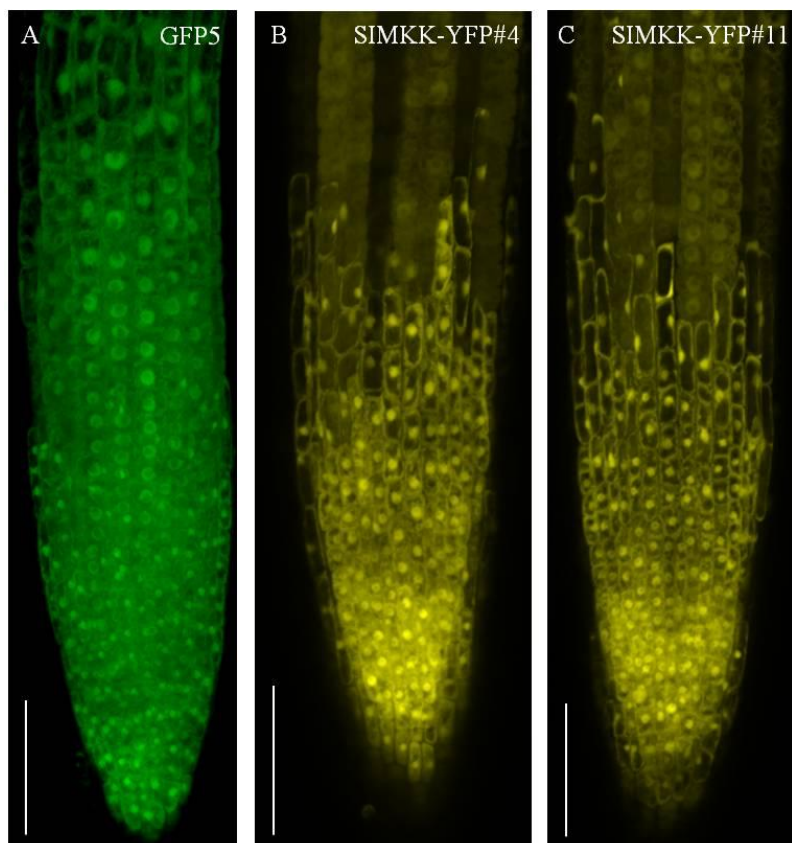
4.2 Distribuce SIMKK-YFP v buňkách kořene a změny v lokalizaci vyvolané abiotickými stresy

Lokalizace proteinu SIMKK v kontrolních podmínkách a po ovlivnění abiotickými stresy (solný stres a stres z nadbytku Zn^{2+}) byla provedena v rostlinách *A. thaliana* stabilně exprimujících SIMKK-YFP pod kontrolou konstitutivně exprimujícího promotoru 35SCaMV. V experimentech byly použity dvě linie s rozdílnou úrovní nadprodukce fúzního proteinu, označované jako SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11. Jako kontrola byla použita transgenní linie *A. thaliana* stabilně exprimující GFP pod kontrolou konstitutivního promotoru 35SCaMV, označovaná jako GFP5. Semenáčky rostlin, které klíčily na pevných mediích, byly 2 d po vyklíčení překládány do mikroskopických komůrek, ve kterých byly stabilizovány po dobu 24 h v $\frac{1}{2}$ MS tekutém médiu bez vitamínů, které obsahovalo buď 500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$ nebo 250 $\text{mmol.l}^{-1} NaCl$. Následně byly semenáčky, které byly stabilizovány v 500 $\mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$, ovlivněny perfuzní aplikací $\frac{1}{2}$ MS tekutého média s obsahem 1

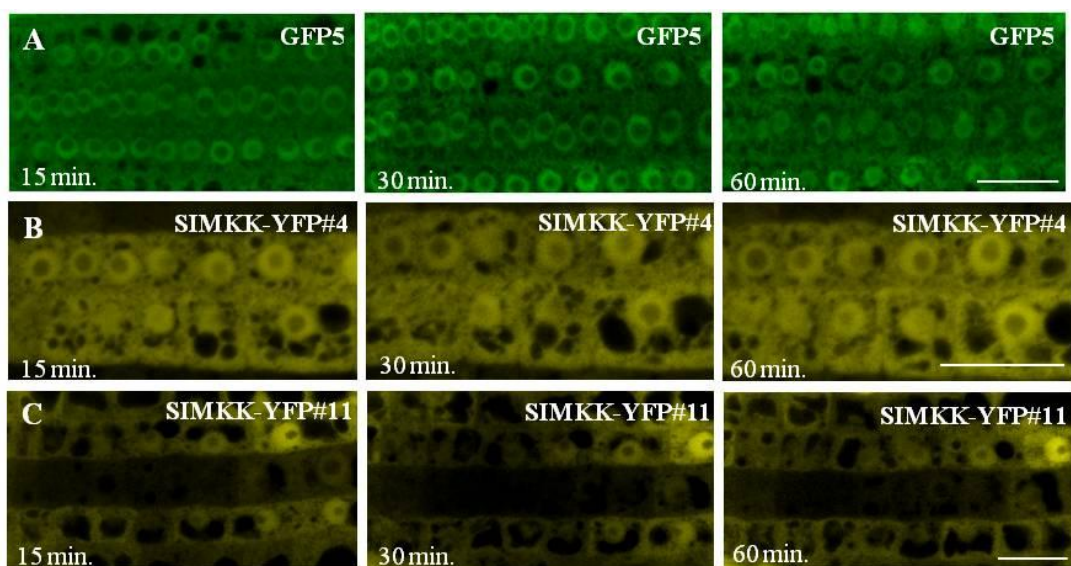
mmol.l⁻¹ Zn²⁺, 2 mmol.l⁻¹ Zn²⁺ nebo 5 mmol.l⁻¹ Zn²⁺. Semenáčky v komůrkách, stabilizované v 250 mmol.l⁻¹ NaCl, byly perfuzní aplikací ovlivněny ½ MS tekutým médiem s obsahem 500 mmol.l⁻¹ NaCl. Po ovlivnění byly semenáčky mikroskopovány *in vivo* konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem s nastavenými parametry pro detekci GFP a YFP.

Distribuce sledovaných proteinů byla studována ve vrcholu primárních kořenů linií GFP5, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 v kontrolních podmínkách (Obr. 14, 15) a po ovlivnění vysokou koncentrací NaCl (Obr. 16, 17). U kontrolní transgenní linie s nadprodukcí GFP byl tento protein v kontrolních podmínkách lokalizován v jádře a v cytoplasmě (Obr. 14A, 15A). V transgenních liniích s nadprodukcí SIMKK-YFP byla pozorována podobná lokalizace, tedy přítomnost SIMKK-YFP v jádře a v cytoplasmě (Obr. 14B, C; 15B, C). Vysoká koncentrace NaCl po perfuzi (500 mmol.l⁻¹) způsobila plazmolýzu všech buněk kořene jak u kontrolní (Obr. 16A), tak u testovaných transgenních linií (Obr. 16B, C). Tento solný a osmotický stres navíc způsobil částečnou relokaci SIMKK-YFP z jádra do cytoplasmy, což je možné pozorovat na základě snižování fluorescence v jádře a jejím zvyšováním v cytoplasmě (Obr. 17B). SIMKK-YFP se navíc po relokaci akumulovala v cytoplasmě ve formě spotů (Obr. 17B, C). Tato tendence byla zřetelná u linie SIMKK-YFP#11 (Obr. 17B). Maximální tvorba těchto spotů byla pozorována po 30 min působení, poté se už počet spotů s lokalizovanou SIMKK-YFP nezvyšoval. U linie SIMKK-YFP#4 tato tendence nebyla tak nápadná a u kontrolní linie GFP5 nedocházelo ani k relokaci a ani k akumulaci fluorescence ve formě spotů (Obr. 17B, C). K plazmolýze buněk, k relokaci a ani k akumulaci fluorescence SIMKK-YFP nedocházelo ani v kontrolních podmínkách a ani při stabilizaci rostlin v 250 mmol.l⁻¹ NaCl (Obr. 14, 15, 17A).

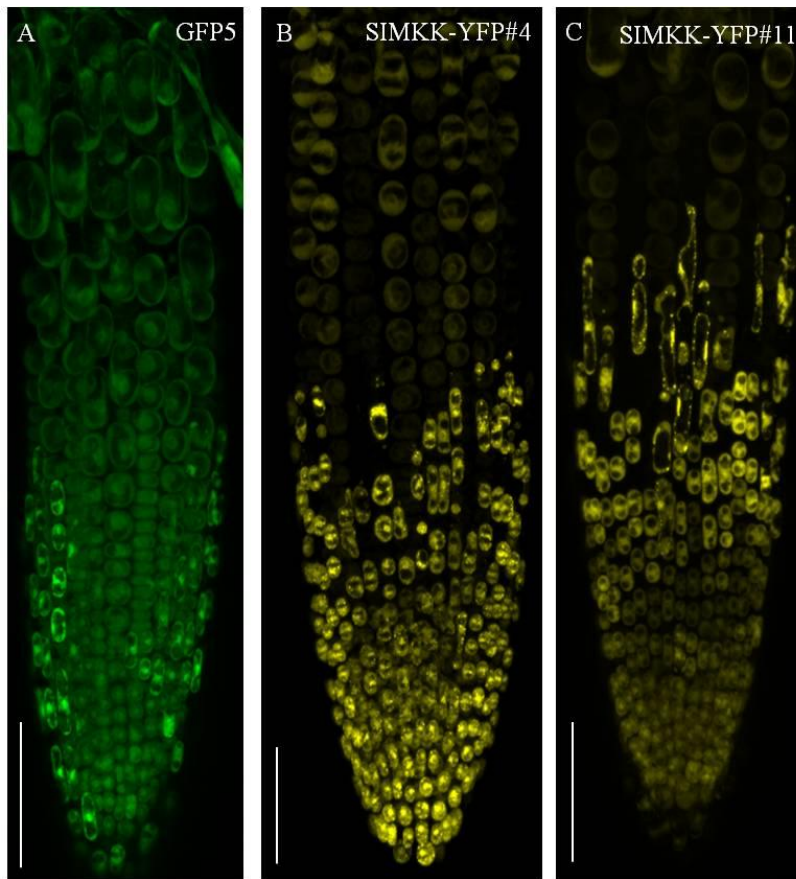
Zvýšené koncentrace Zn²⁺ způsobovaly kořenům rostlin stres, který vedl k tvorbě obdobných fluorescenčních spotů jako v případě NaCl. Nedocházelo k plazmolýze buněk, avšak relokace SIMKK-YFP a její akumulace ve formě spotů byla prokazatelně pozorována v případě maximální použité koncentrace 5 mmol.l⁻¹ Zn²⁺ (Obr. 18D, E). Mikroskopickou detekcí bylo prokázáno, že se tyto cytoplasmatické spoty objevují u obou SIMKK-YFP linií a v průběhu času se jejich počet navyšuje (Obr. 18D, E). Při aplikaci 1 mmol.l⁻¹ Zn²⁺ (Obr. 18B) a 2 mmol.l⁻¹ Zn²⁺ (Obr. 18C) nedocházelo k akumulaci SIMKK-YFP v cytoplasmatických spotech, stejně jako v případě, kdy byly semenáčky mikroskopovány přímo po stabilizaci v 500 μmol.l⁻¹ Zn²⁺ (Obr. 18A). Tyto struktury nebyly pozorovány ani v kontrolní linii GFP5 (Obr. 18D, E).



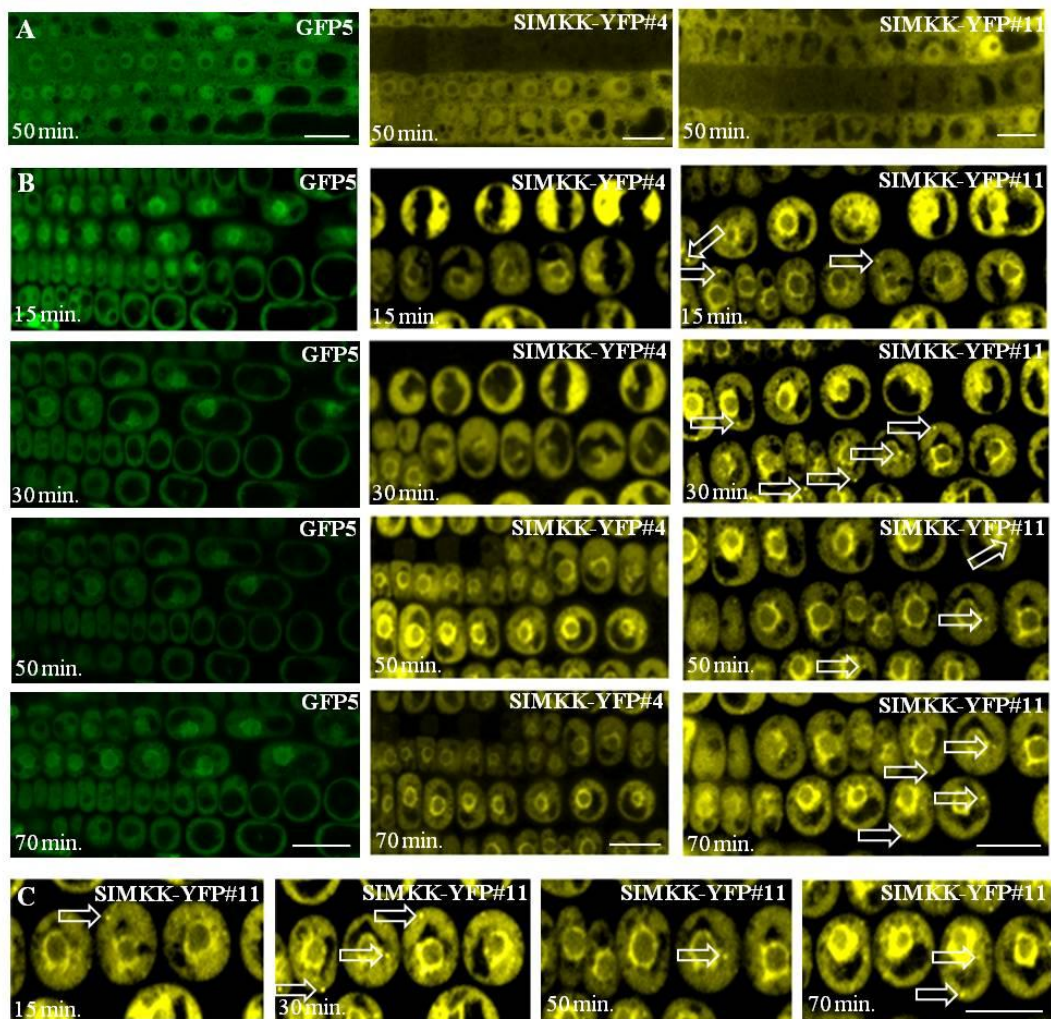
Obr. 14 Expresa a lokalizace fluorescenčních proteinů ve špičkách kořene transgenických linií GFP5 (A), SIMKK-YFP#4 (B) a SIMKK-YFP#11 (C) v kontrolních podmínkách. Viditelný je rozdíl v intenzitě exprese SIMKK-YFP v epidermálních buňkách meristematické zóny a buněk boční kořenové čepičky, u kterých je exprese SIMKK-YFP vyšší. Měřitko 100 μm .



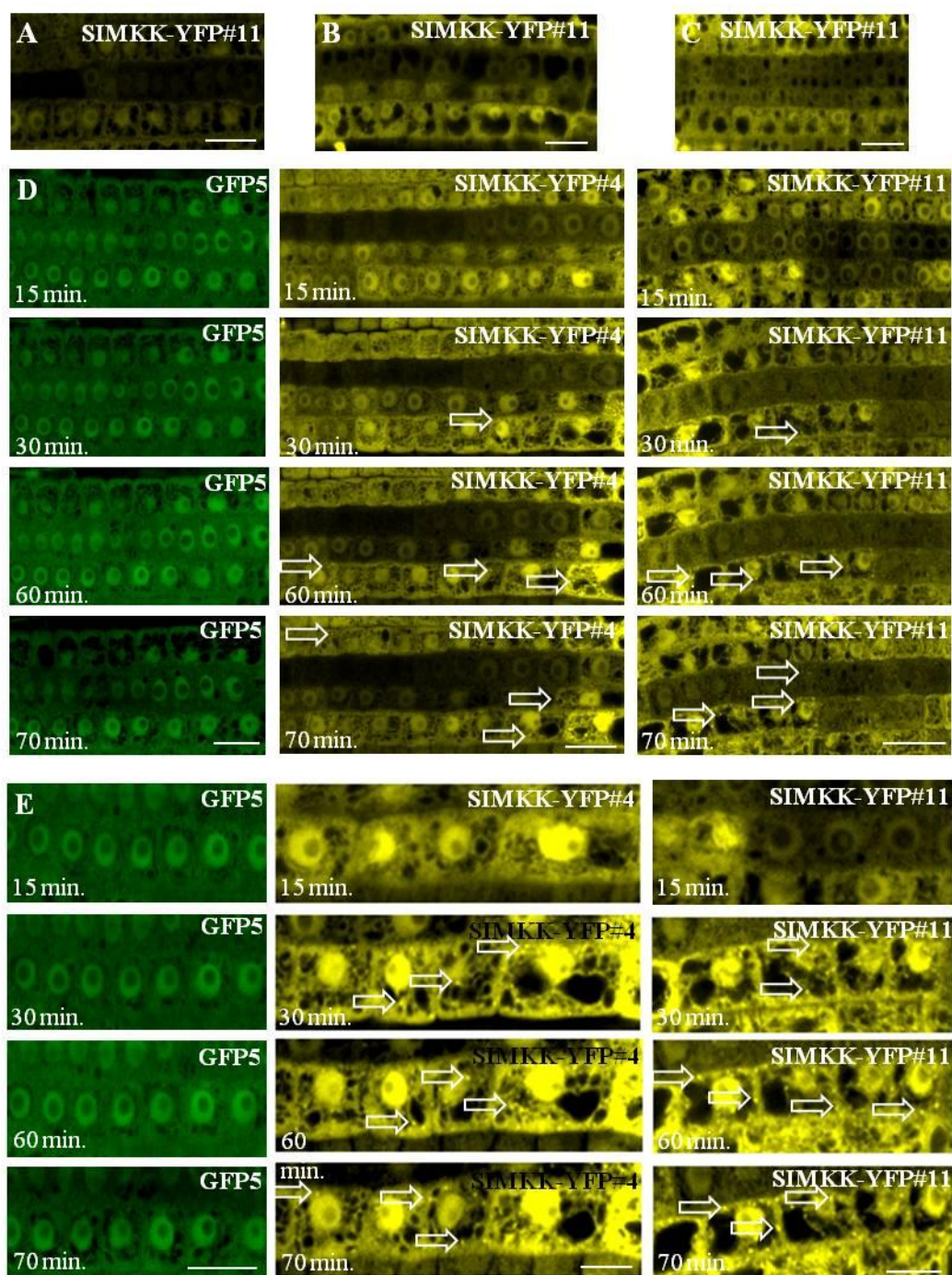
Obr. 15 Epidermální buňky kořene transgenických linií GFP5 (A), SIMKK-YFP#4 (B) a SIMKK-YFP#11 (C) v kontrolních podmínkách po 24 h stabilizaci semenáčků v $\frac{1}{2}$ MS médiu. Kořeny byly snímány 15, 30 a 60 min po umístění do mikroskopu. Měřitko 20 μm .



Obr. 16 Expres a lokalizace fluorescenčních proteinů v plazmolyzovaných buňkách kořene transgenních linií GFP5 (A), SIMKK-YFP#4 (B) a SIMKK-YFP#11 (C) stabilizovaných 24 h v $\frac{1}{2}$ MS médiu obsahující 250 mmol.l^{-1} NaCl, které byly následně ovlivněny 500 mmol.l^{-1} NaCl. Rozdíl v intenzitě exprese fluorescenčních proteinů v epidermálních buňkách meristematické zóny a v buňkách boční kořenové čepičky je viditelný u všech linií. Měřítka $100 \mu\text{m}$.



Obr. 17 Epidermální buňky kořene transgenických linií GFP5, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 po ovlivnění NaCl. Po 24 h stabilizaci semenáčků v $\frac{1}{2}$ MS médiu obsahujícím 250 mmol.l^{-1} NaCl buňky kořene linií s expresí SIMKK-YFP nevykazují žádné viditelné změny (A). Buňky byly snímány 50 min po umístění do mikroskopu. Po 24 h stabilizaci semenáčků v $\frac{1}{2}$ MS médiu s obsahem 250 mmol.l^{-1} NaCl a následné perfuzi s 500 mmol.l^{-1} NaCl dochází k plasmolýze buněk a k relokaci SIMKK-YFP z jádra do cytoplasmy (B). Lokalizace SIMKK-YFP v cytoplasmatických spotech je znázorněna šipkami (B, C). Buňky byly snímány 15, 30, 50 a 70 min po perfuzi s 500 mmol.l^{-1} NaCl. Měřítko $10 \mu\text{m}$.

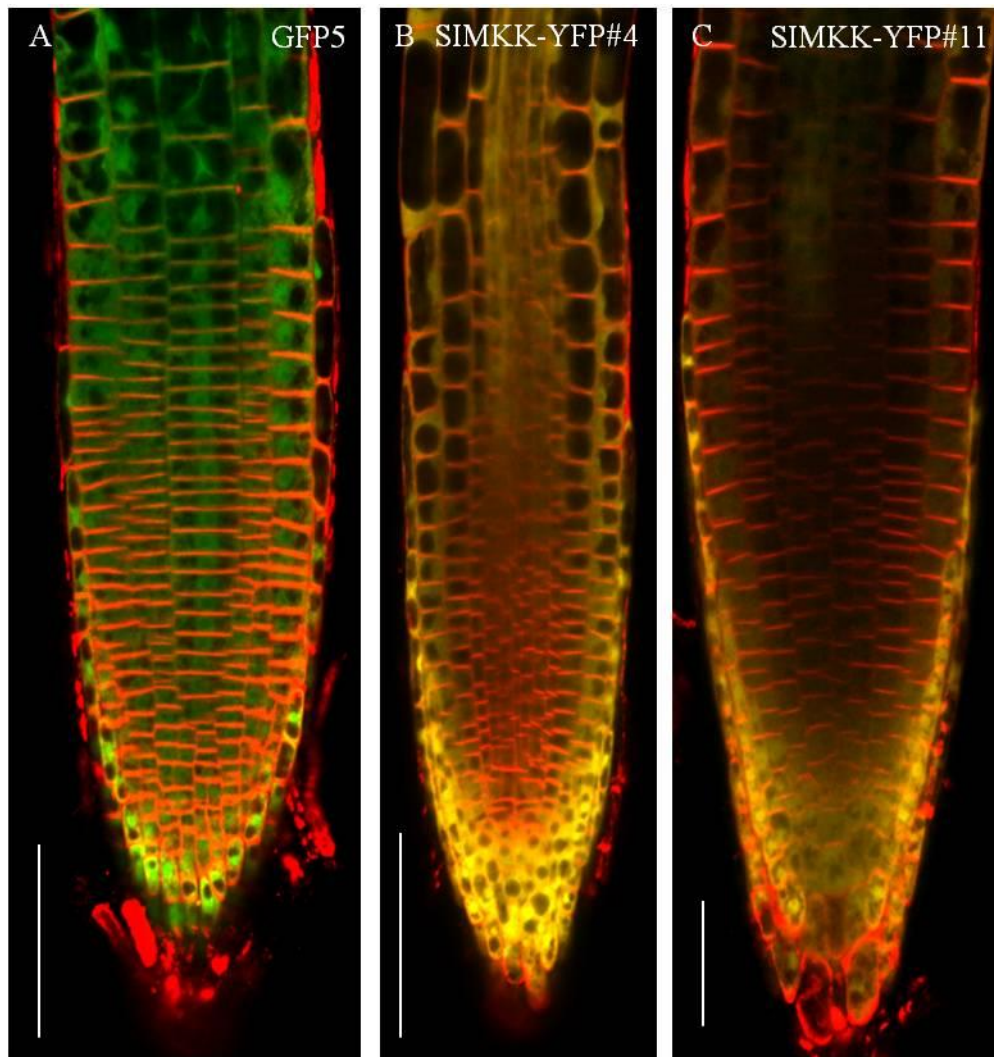


Obr. 18 Epidermální buňky kořene transgenických linií GFP5, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 po ovlivnění se Zn^{2+} . Kořeny po 24 h stabilizaci semenáčků v $\frac{1}{2}$ MS médiu obsahující $500 \mu\text{mol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (A) byly následně perfuzí ovlivněny s $1 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (B), $2 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (C) a $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (D, E). Lokalizace SIMKK-YFP v cytoplasmatických spotech je znázorněna šipkami (D, E). Buňky byly snímány 60 min po umístění do mikroskopu (A), 60 min po perfuzi s 1 a $2 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (B, C), a 15, 30, 60 a 70 min po perfuzi s $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (D, E). Měřítka $10 \mu\text{m}$.

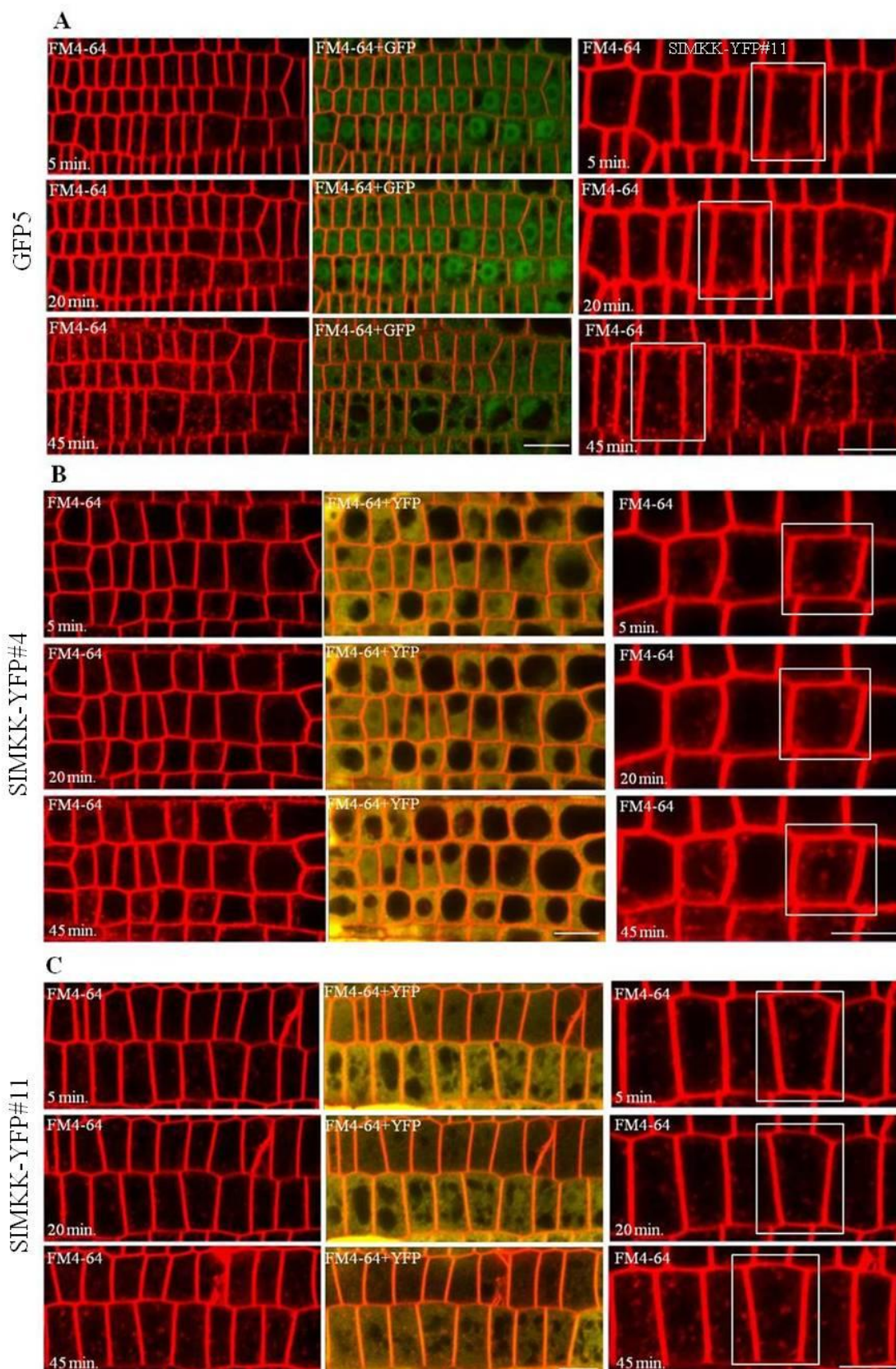
4.3 Mikroskopická dokumentace průběhu endocytózy *in vivo* v buňkách kořene transgenních linií po ovlivnění zinkem

K analýze průběhu endocytózy a k detekci endozomálních kompartmentů bylo využito vitální lipofilní barvičky FM4-64, která se rutinně využívá jako marker plasmatické membrány. K analýze byly využity 3 d staré semenáčky kontrolní linie GFP5, jako i testovaných linií SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11. Rostliny byly barveny v kontrolních podmínkách a po ovlivnění $500 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$, a následně byl časový průběh značení a internalizace membrán dokumentován mikroskopicky pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu při nastavení optimálních podmínek pro detekci GFP, YFP a FM4-64.

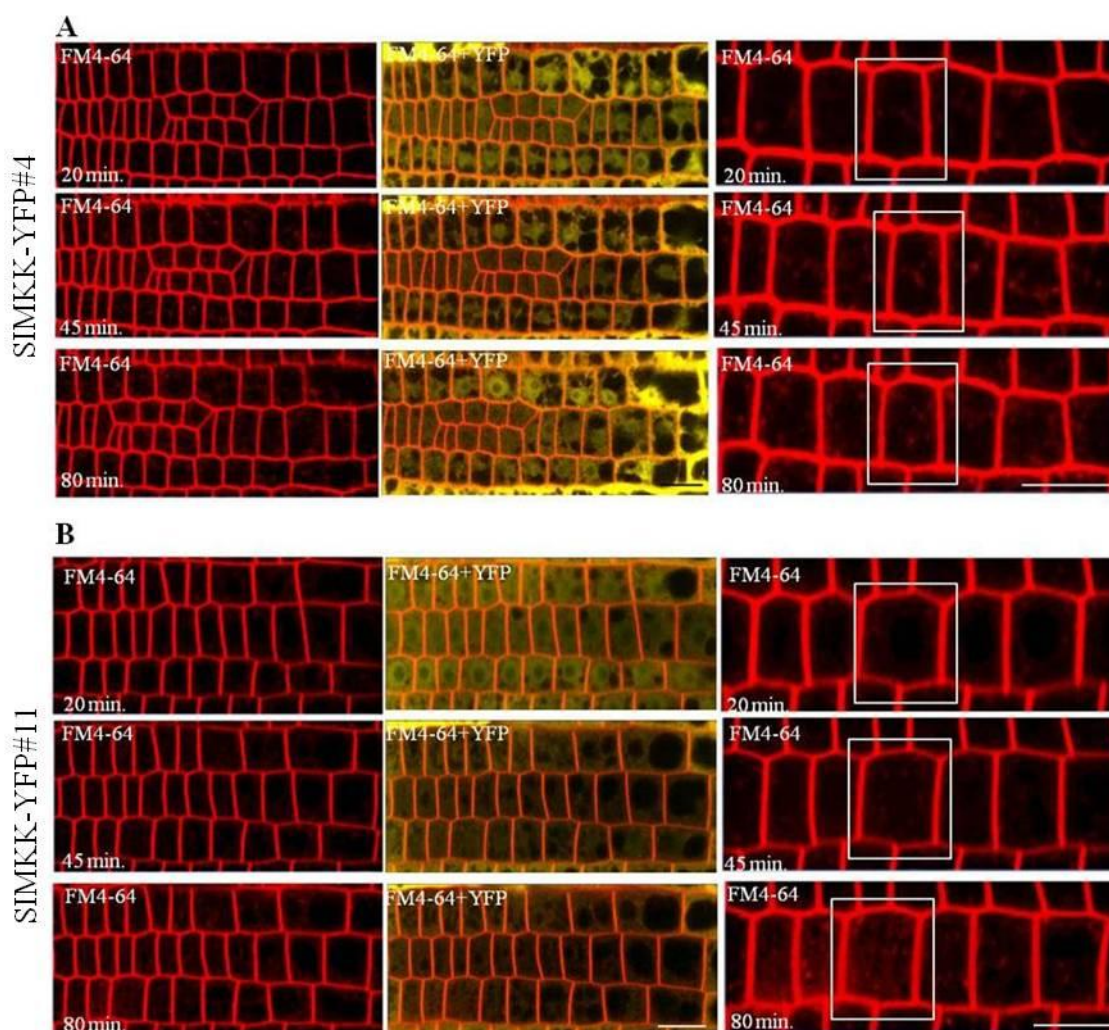
Přímo po barvení kořenů linií GFP5, SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11 s FM4-64 v kontrolních podmínkách bylo možné pozorovat signál pouze v plasmatické membráně kořenových buněk (Obr. 19). U rostlin, které byly 24 h stabilizovány v kontrolním $\frac{1}{2}$ MS tekutém médiu bez vitamínů, detailnější analýza časového průběhu internalizace barviva prokázala, že endozomy u transgenních SIMKK-YFP linií (Obr. 20B, C) se barvily pomaleji a také v menším počtu než v kontrolní linii GFP5 (Obr. 20A). Vizuální hodnocení naznačilo, že rozdíly v intenzitě barvení mohou být i mezi SIMKK-YFP expresními liniemi v témže čase navzájem (Obr. 20B, C). U rostlin s expresí SIMKK-YFP, které byly kultivovány 24 h v $\frac{1}{2}$ MS tekutém médiu bez vitamínů s obsahem $500 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$ bylo pozorováno zpomalení průniku barviva do endozomů (Obr. 21). Např. linie SIMKK-YFP#4 (Obr. 21) ani po 80 min barvení nevykazovala takový počet značených endozomů, jako při kontrolních podmínkách po 45 min. Linie SIMKK-YFP#11 také vykazovala snížený počet značených endozomů po ovlivnění Zn^{2+} při porovnání s kontrolní situací (po 45 min barvení), ovšem 80 min po začátku barvení byla intenzita značení endozomů u této linie mírně vyšší, než u linie SIMKK-YFP#4 (Obr. 21B).



Obr. 19 Kořenové špičky transgenních linií GFP5 (A), SIMKK-YFP#4 (B) a SIMKK-YFP#11 (C) bezprostředně po barvení s FM4-64 v kontrolních podmínkách. Měřítko 100 μ m.



Obr. 20 Epidermální buňky kořene transgenních linií GFP5 (A), SIMKK-YFP#4 (B) a SIMKK-YFP#11 (C), barvené s FM4-64 v kontrolních podmínkách. Boxy vyznačují detaily postupného barvení endozomů v buňkách v časové závislosti. Buňky byly snímány 5, 20 a 45 min po barvení s $4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ FM4-64. Měřítka 10 μm .



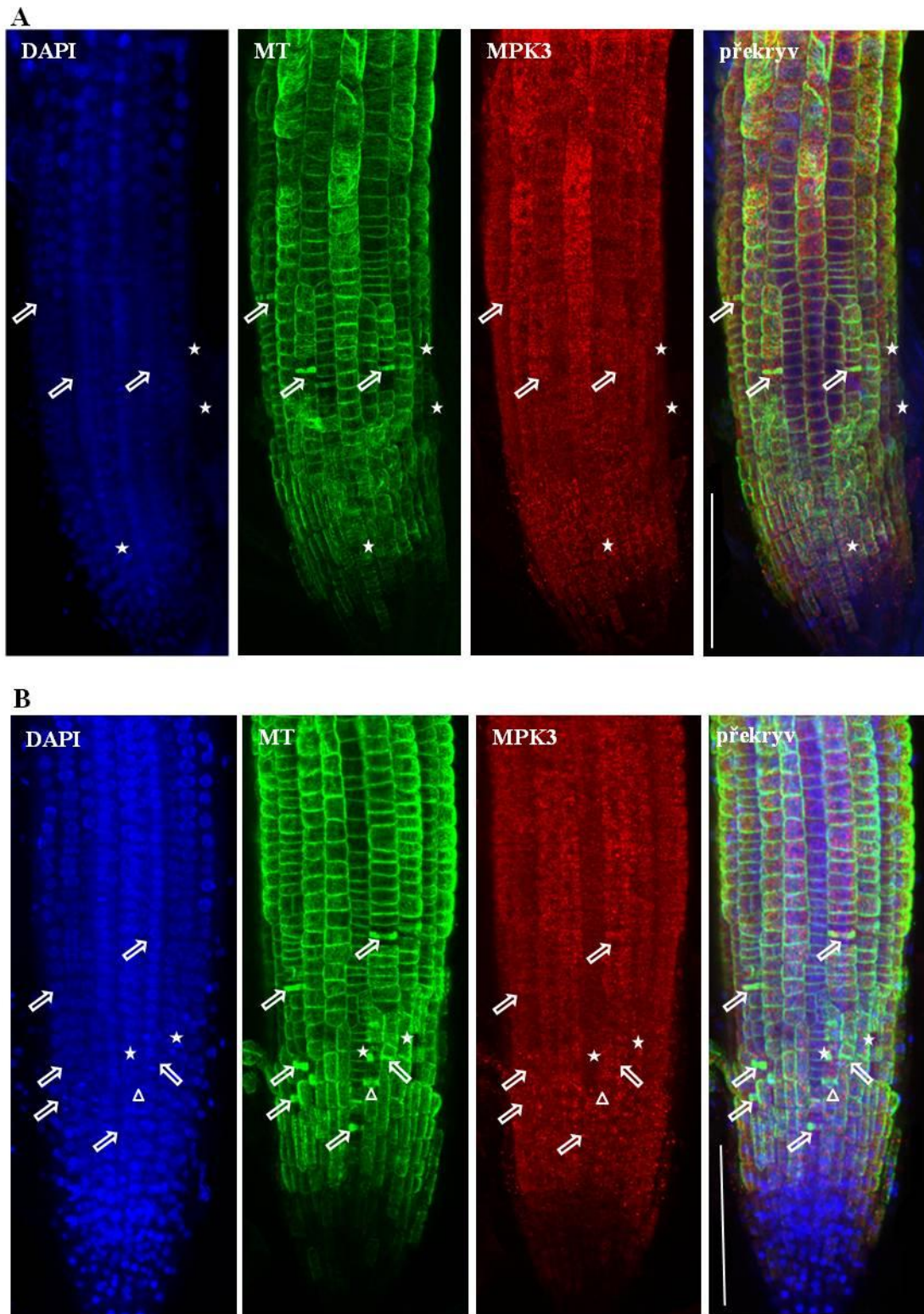
Obr. 21 Epidermální buňky kořene transgenních linií SIMKK-YFP#4 (A) SIMKK-YFP#11 (B), barvené s FM4-64 po ovlivnění $500 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{Zn}^{2+}$. Boxy vyznačují detaily postupného barvení endozomů v buňkách v časové závislosti. Buňky byly snímány 20, 45 a 80 min po barvení s $4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ FM4-64. Měřítka $10 \mu\text{m}$.

4.4 Imunohistochemická detekce MPK3 a MPK6 v kořenových buňkách po ovlivnění vysokou koncentrací zinku

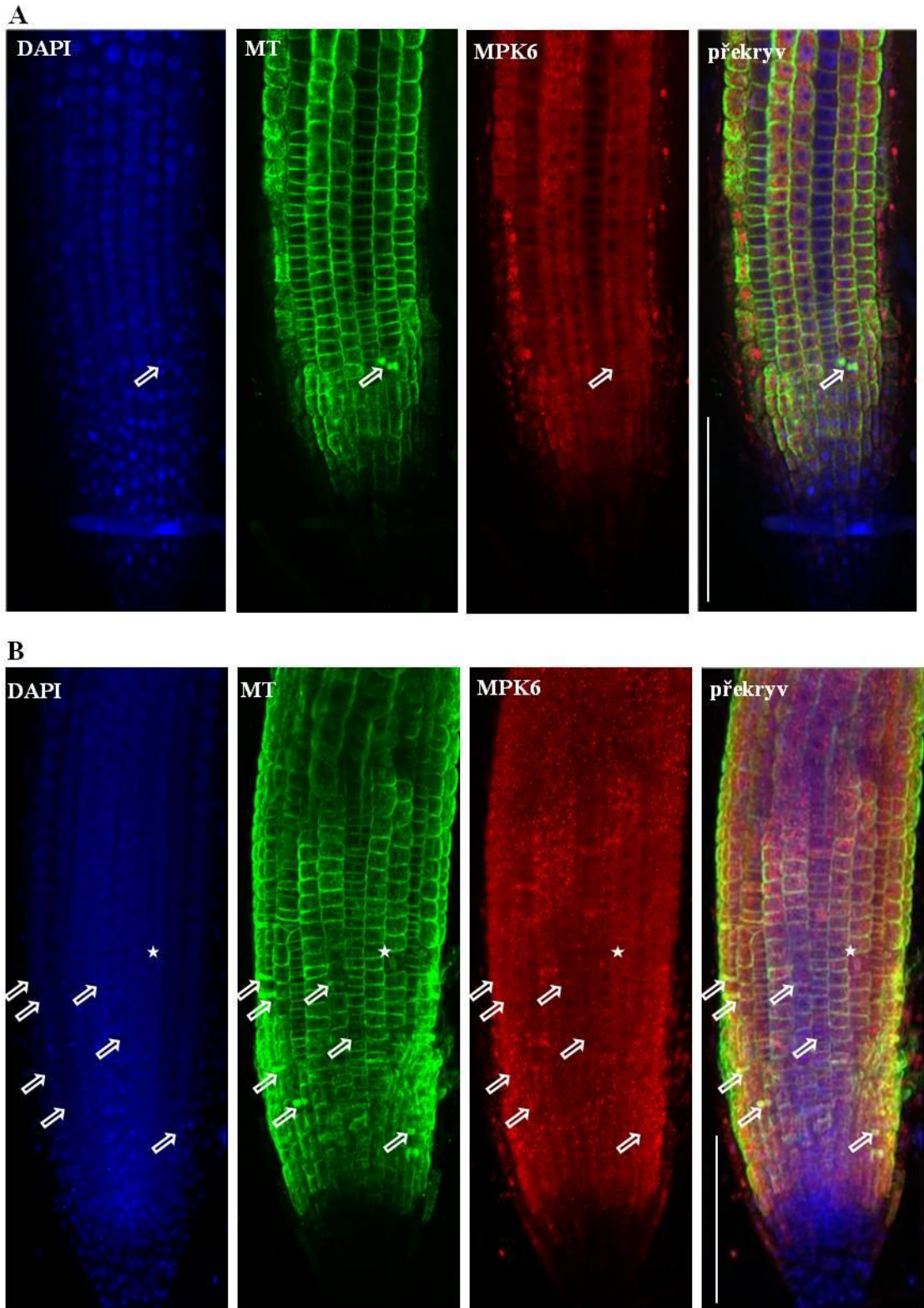
Ke specifické imunodetekci proteinů MPK3 a MPK6 a k jejich lokalizaci v kořenech rostlin *A. thaliana* divokého typu (Col-0) a transgenních linií s expresí SIMKK-YFP byla využita metoda whole mount, tedy imunofluorescenčního značení proteinů v celém kořenu. K tomuto účelu byly připraveny semenáčky rostlin Arabidopsis, které byly odebírány 3 d po vyklíčení. Pro dokumentaci kontrolní lokalizace MAPK proteinů byly rostliny rostoucí na povrchu pevného $\frac{1}{2}$ MS média buď přímo fixovány ve fixačním médiu (dále označované jako fixovaná kontrola), nebo byly zalaty na dobu 30 min kontrolním $\frac{1}{2}$ MS tekutým médiem bez vitamínů (dále označované jako kontrola).

Rostliny ovlivněné stresem z nadbytku Zn^{2+} byly zality $\frac{1}{2}$ MS tekutým médiem bez vitamínů s obsahem $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ (dále označované jako Zn^{2+} stres). Po 30 min působení a po přípravě vzorků byly na proteiny MPK3 a MPK6 v buňkách specificky navázány primární protilátky proti MPK3 nebo MPK6. Tato vazba byla posléze detekována pomocí fluorescenčně značené sekundární protilátky s excitačním maximem 546 nm. Celková morfologie buněk a jednotlivá stadia buněčného dělení byla hodnocena prostřednictvím vizualizace MT. MT byly detekovány pomocí primární protilátky proti α -tubulinu a fluorescenčně značené sekundární protilátky s excitačním maximem 488 nm. K vizualizaci buněčných jader bylo využito DNA-specifické fluorescenční barvivo DAPI s emisním maximem 461 nm. Trvalé preparáty s tímto trojitým značením byly mikroskopicky studovány v konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu.

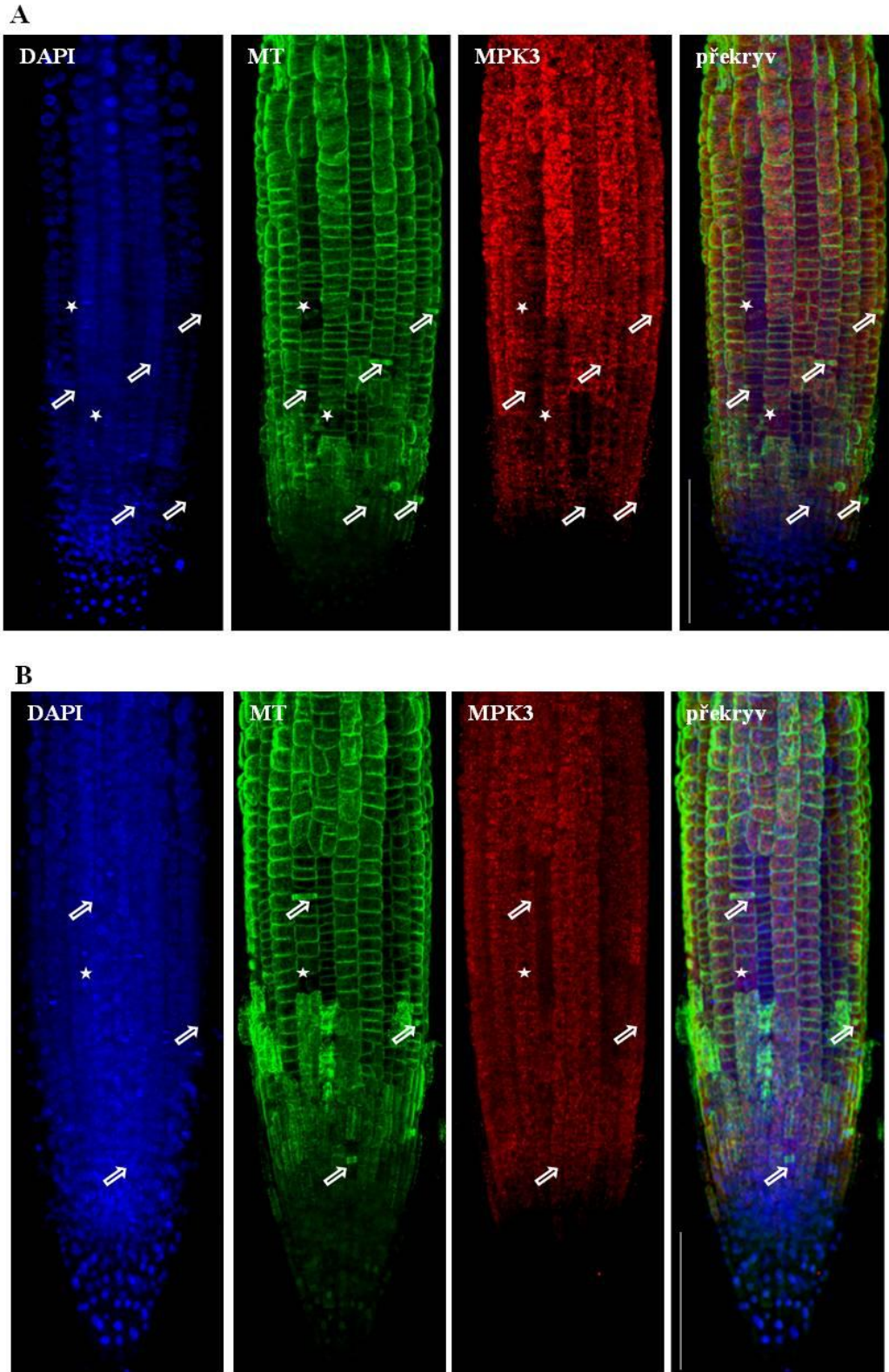
Protokol přípravy preparátů na imunofluorescenční detekci antigenů v meristematické zóně kořene užívaný v naší laboratoři byl pro *Arabidopsis* optimalizován. Poskytuje proto možnost studovat velký počet epidermálních buněk v různých fázích buněčného cyklu. Zajímavým faktem bylo, že zatím co u transgenních linií SIMKK-YFP#11 (Obr. 26, 27) a SIMKK-YFP#4 (Obr. 24, 25) nebyl počet dělicích se epidermálních buněk kořene působením Zn^{2+} ovlivněn, u kontrolní linie Col-0 po vlivu Zn^{2+} bylo možné pozorovat více epidermálních buněk ve stadiích buněčného dělení než v kontrolních podmínkách (Obr. 22, 23).



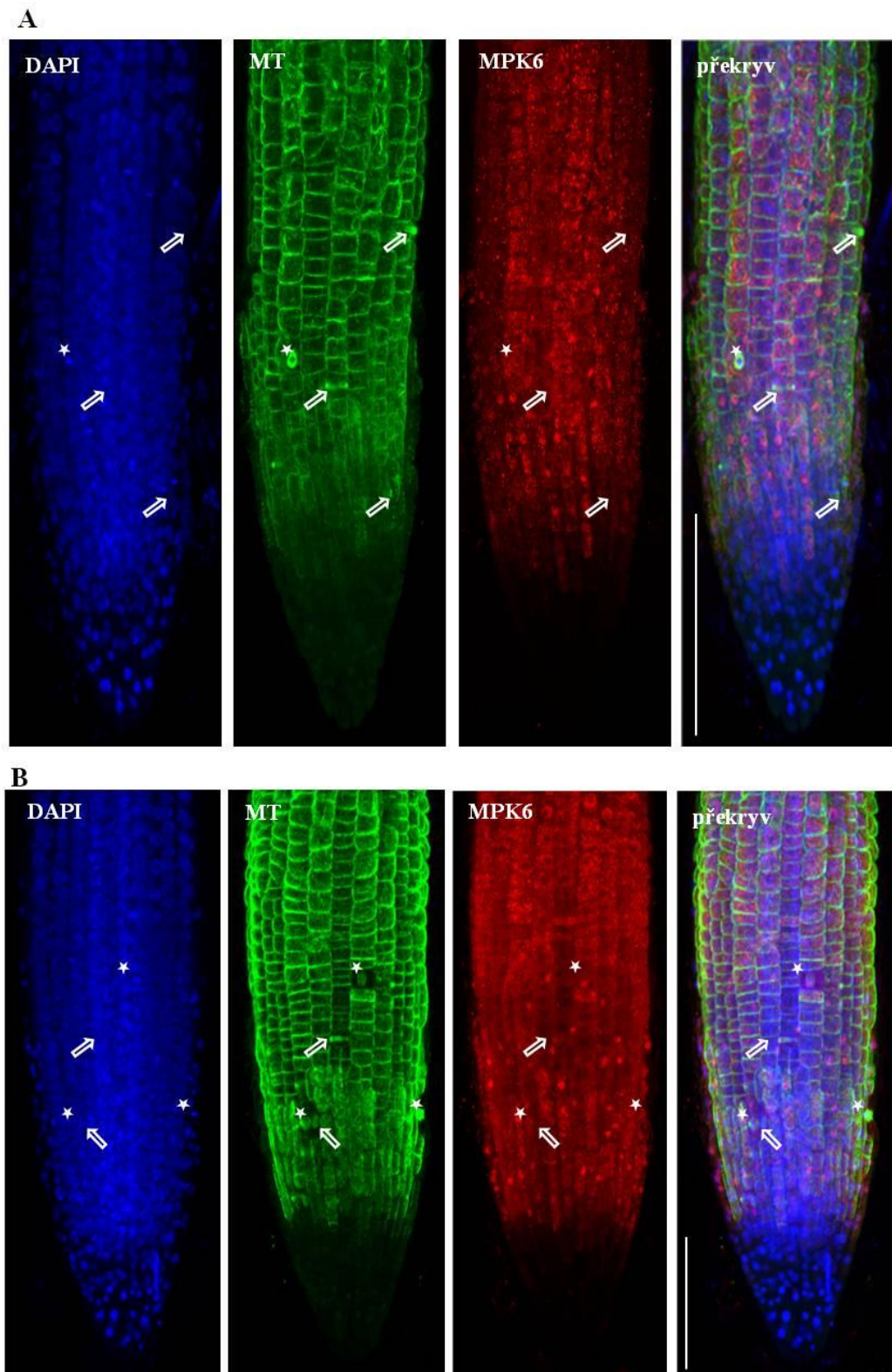
Obr. 22 Lokalizace mikrotubulů a MPK3 v kořenech rostlin Col-0 metodou whole mount imunofluorescence. Distribuce MPK3 a mikrotubulů v epidermálních buňkách v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Šipky znázorňují fragmoplast, hvězdičky znázorňují dělicí vřeténko, trojúhelník PPB. Měřítko 100 μm .



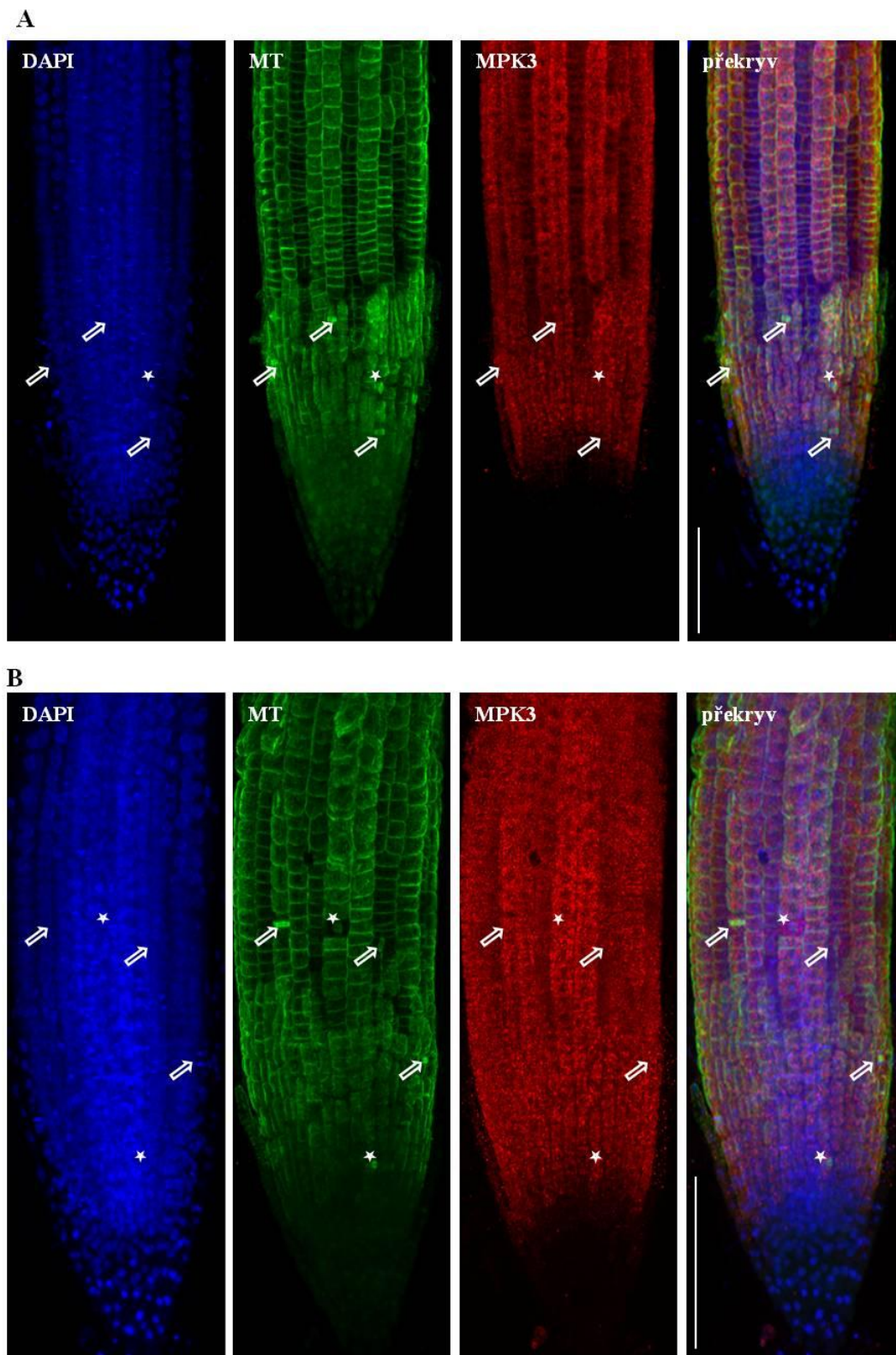
Obr. 23 Lokalizace mikrotubulů a MPK6 v kořenech rostlin Col-0 metodou whole mount imunofluorescence. Distribuce MPK6 a mikrotubulů v epidermálních buňkách v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Šipky znázorňují fragmoplast, hvězdičky znázorňují dělící vřeténko. Měřítka 100 μm .



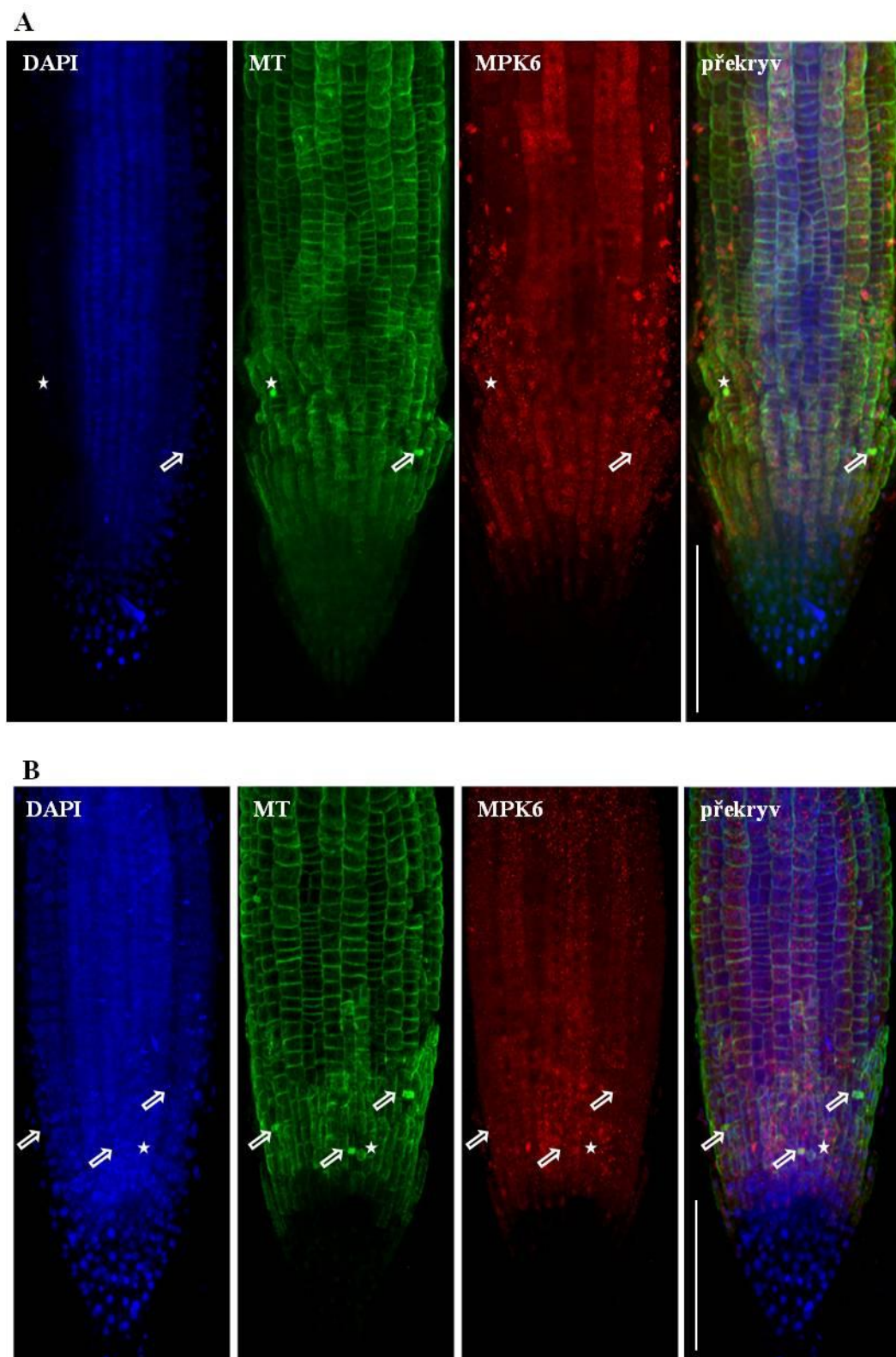
Obr. 24 Lokalizace mikrotubulů a MPK3 v kořenech rostlin linie SIMKK-YFP#4 metodou whole mount imunofluorescence. Distribuce MPK3 a mikrotubulů v epidermálních buňkách v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Šipky znázorňují fragmoplast, hvězdičky znázorňují dělicí vřeténko. Měřítko 100 μm .



Obr. 25 Lokalizace mikrotubulů a MPK6 v kořenech rostlin linie SIMKK-YFP#4 metodou whole mount imunofluorescence. Distribuce MPK6 a mikrotubulů v epidermálních buňkách v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Šipky znázorňují fragmoplast, hvězdičky znázorňují dělicí vřeténko. Měřítka 100 μm .

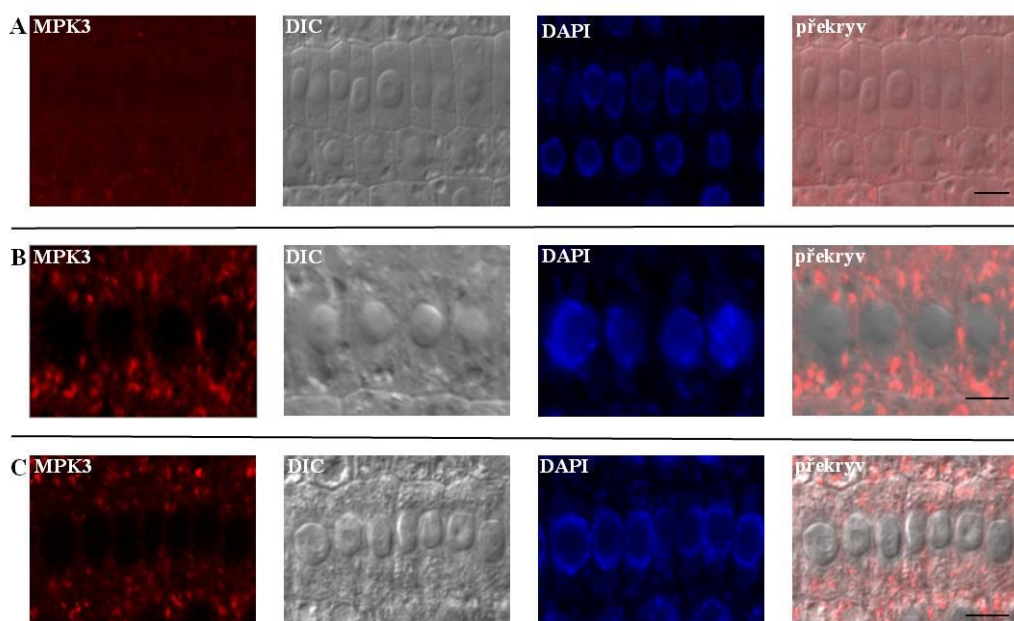


Obr. 26 Lokalizace mikrotubulů a MPK3 v kořenech rostlin linie SIMKK-YFP#11 metodou whole mount imunofluorescence. Distribuce MPK3 a mikrotubulů v epidermálních buňkách v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Šipky znázorňují fragmoplast, hvězdičky znázorňují dělicí vřetenko. Měřítko 100 μm .

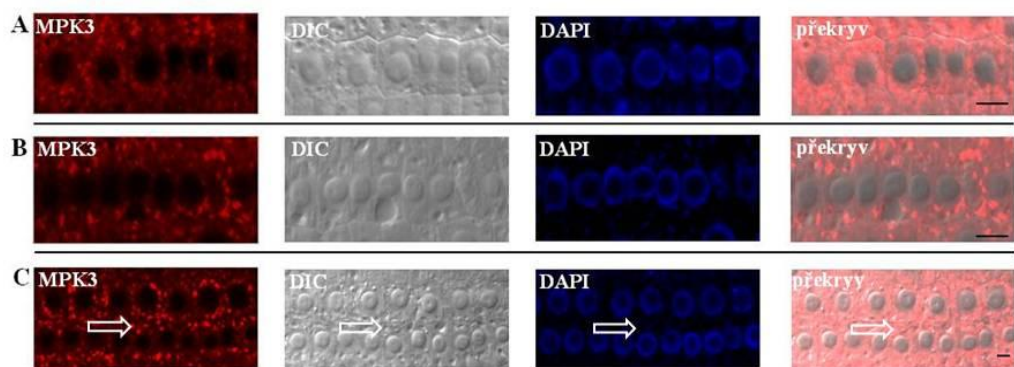


Obr. 27 Lokalizace mikrotubulů a MPK6 v kořenech rostlin linie SIMKK-YFP#11 metodou whole mount imunofluorescence. Distribuce MPK6 a mikrotubulů v epidermálních buňkách v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Šipky znázorňují fragmoplast, hvězdičky znázorňují dělicí vřeténko. Měřítko 100 μm .

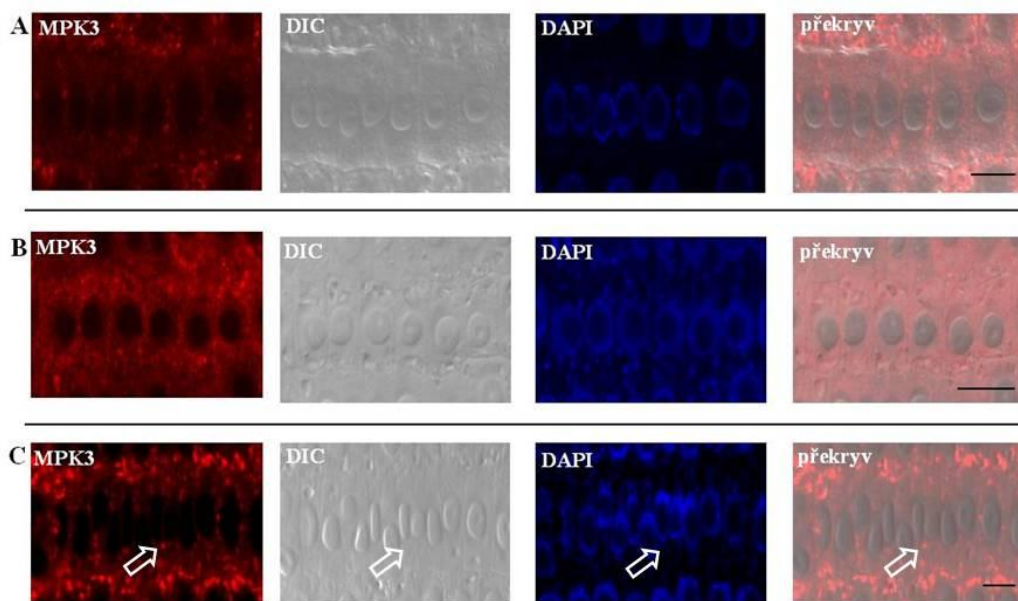
Protein MPK3 byl v interfázních buňkách kořene Col-0 v případě fixované kontroly (bez zalití) lokalizován v jadérku, v jádře a v cytoplasmě (Obr. 28A). V kontrole po zalití a po Zn^{2+} stresu byl lokalizován ve větších spotech v cytoplasmě, avšak chyběl v jádře a v jadérku (Obr. 28B,C). V buňkách SIMKK-YFP linií se MPK3 protein nacházel v cytoplasmě interfázních buněk ve spotech v obou kontrolních variantách a i po Zn^{2+} stresu, přičemž jádra a jadérka byla negativní (Obr. 29, 30). Po ovlivnění Zn^{2+} byly navíc tyto spoty v cytoplasmě intenzivnější a větší než u kontrol.



Obr. 28 Lokalizace MPK3 v interfázních epidermálních buňkách v meristematické zóně kořene Col-0. Lokalizace proteinu MPK3 po přímé fixaci rostlin (A), po zalití rostlin kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Po zalití rostlin kontrolním médiem anebo médiem s obsahem $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ po dobu 30 min došlo k akumulaci MPK3 do cytoplasmatických spotů (B, C). Měřítko 10 μm .

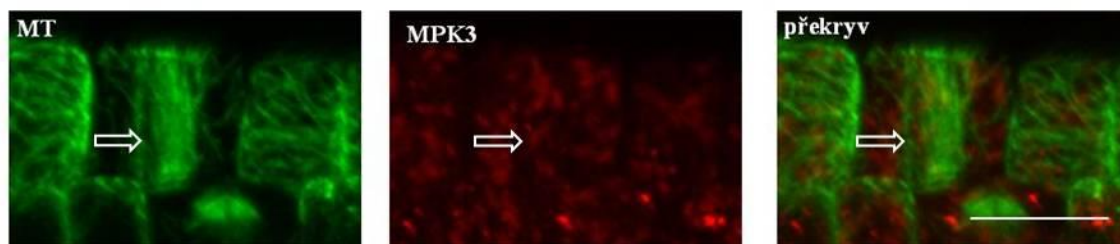


Obr. 29 Lokalizace MPK3 v interfázních epidermálních buňkách v meristematické zóně kořene linie SIMKK-YFP#4. Lokalizace proteinu MPK3 po přímé fixaci rostlin (A), po zalití rostlin kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Šípky označují intenzivně značené spoty v cytoplasmě (C). Měřítko 10 μm .

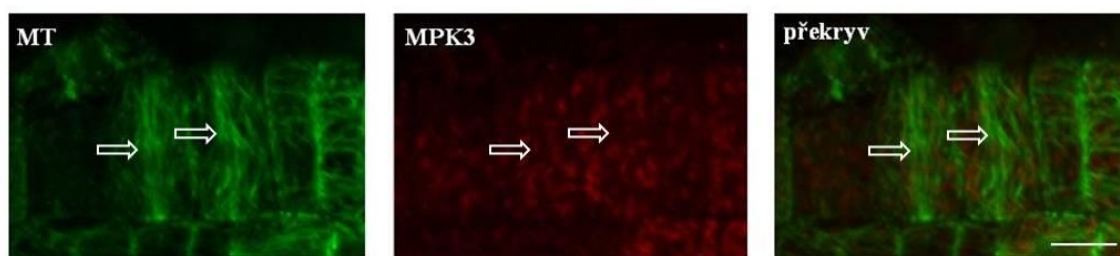


Obr. 30 Lokalizace MPK3 v interfázních epidermálních buňkách v meristematické zóně kořene linie SIMKK-YFP#11. Lokalizace proteinu MPK3 po přímé fixaci rostlin (A), po zalití rostlin kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Šipky označují intenzivně značené spoty v cytoplasmě (C). Měřítka 10 μm .

V průběhu mitotického dělení byl MPK3 protein u Col-0 lokalizován ve spotech v kortikální zóně buněk, a tudíž i v blízkosti PPB na jeho cytoplasmatické straně. Specifická asociace s mikrotubuly PPB ale pozorována nebyla. Tato situace byla pozorována i po Zn^{2+} stresu (Obr. 31). Obdobná situace byla zaznamenána u linie SIMKK-YFP#4 v kontrolních podmínkách (Obr. 32). Bohužel, v preparátech pro lokalizaci MPK3 nebyly už další figury PPB u žádného kořene nalezeny.

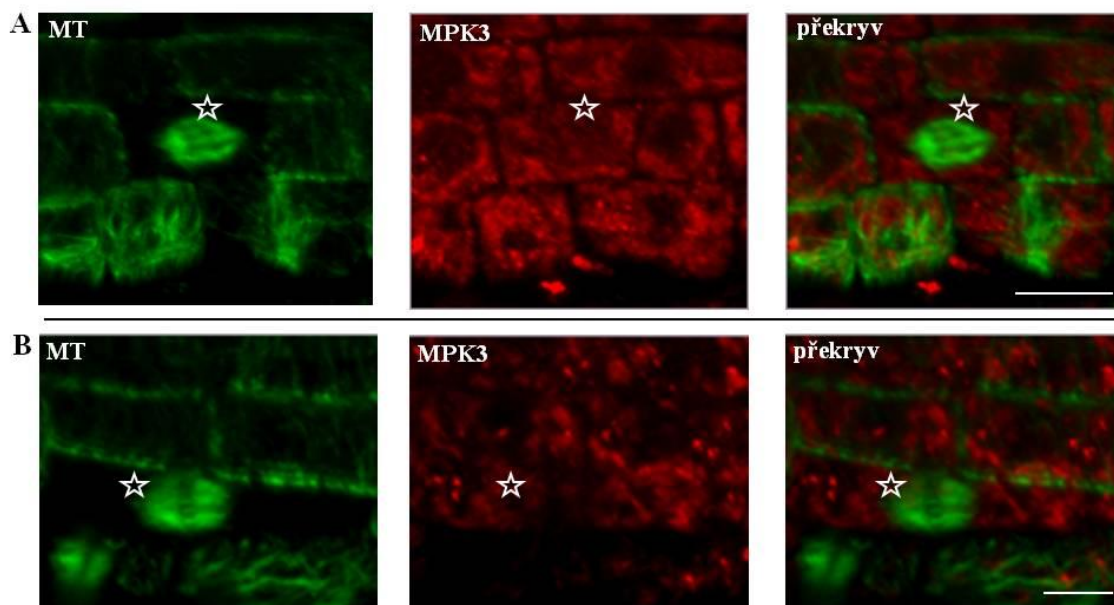


Obr. 31 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermální buňce rostliny Col-0 před vstupem do buněčného dělení po ovlivnění Zn^{2+} . Protein MPK3 (šipky) je lokalizován v kortexu buňky i v místech, kde se nachází předprofázní svazek MT (PPB). Měřítka 10 μm .

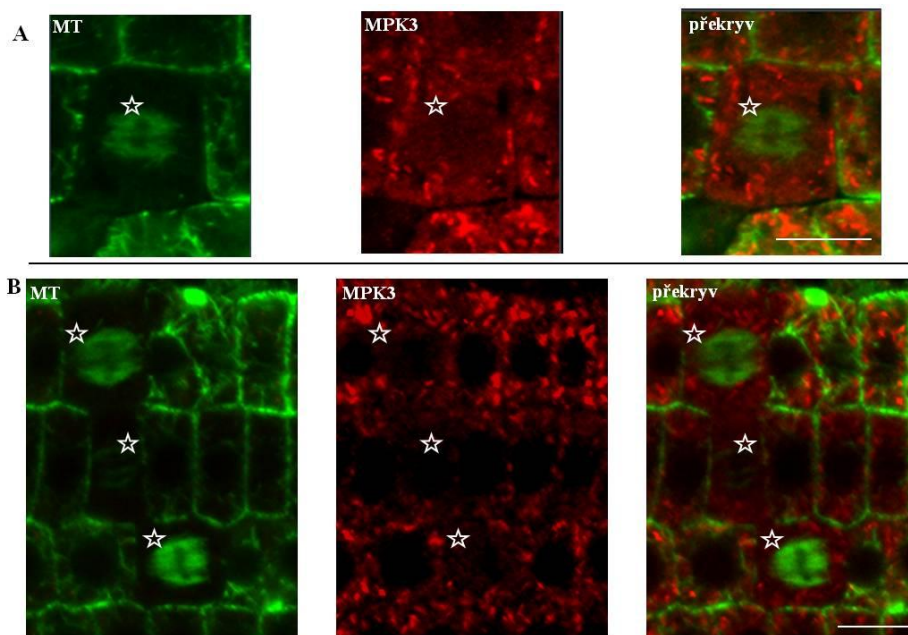


Obr. 32 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermální buňce rostliny SIMKK-YFP#4 před vstupem do buněčného dělení v kontrolních podmínkách. Pozice předprofázního svazku MT (PPB) a MPK3 je vyznačena šipkou. Měřítka 10 μm .

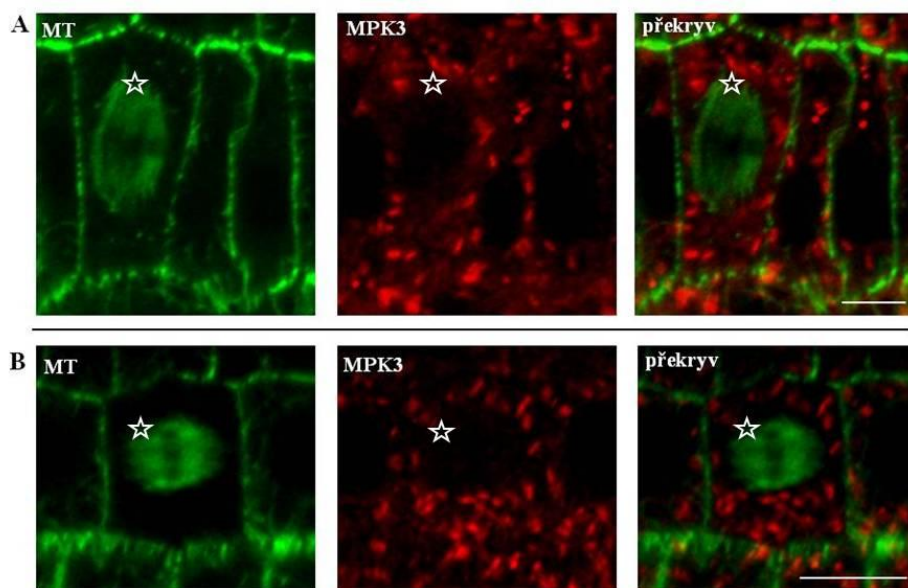
V případě lokalizace MPK3 proteinu při formování dělicího vřeténka v průběhu anafáze bylo pozorováno, že Zn^{2+} na distribuci MPK3 nemá zásadní vliv. Byl ale pozorován rozdíl v lokalizaci MPK3 mezi jednotlivými liniemi. V případě Col-0 (Obr. 33) a SIMKK-YFP#4 (Obr. 34) byl protein MPK3 lokalizován v kortexu buněk v okolí mitotického vřeténka, u transgenní linie SIMKK-YFP#4 navíc ve velkých spotech (Obr. 34). U linie SIMKK-YFP#11 byl protein MPK3 též lokalizován ve spotech, případná topologická asociace s periferií mitotického vřeténka byla ale méně patrná, především po ovlivnění se Zn^{2+} (Obr. 35).



Obr. 33 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermálních buňkách rostlin Col-0 ve stádiu anafáze. Lokalizace proteinu MPK3 v blízkosti mitotického vřeténka (hvězdičky) v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Měřítka 10 μm .



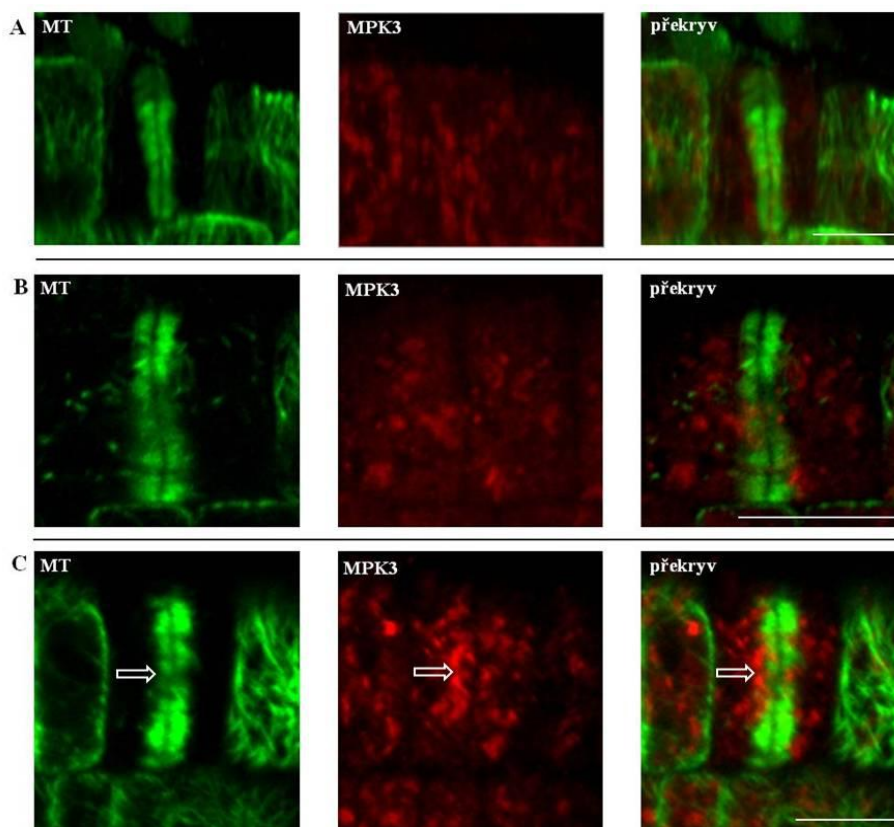
Obr. 34 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#4 ve stádiu anafáze. Lokalizace proteinu MPK3 v blízkosti mitotického vřeténka (hvězdičky) v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Měřítka 10 μm .



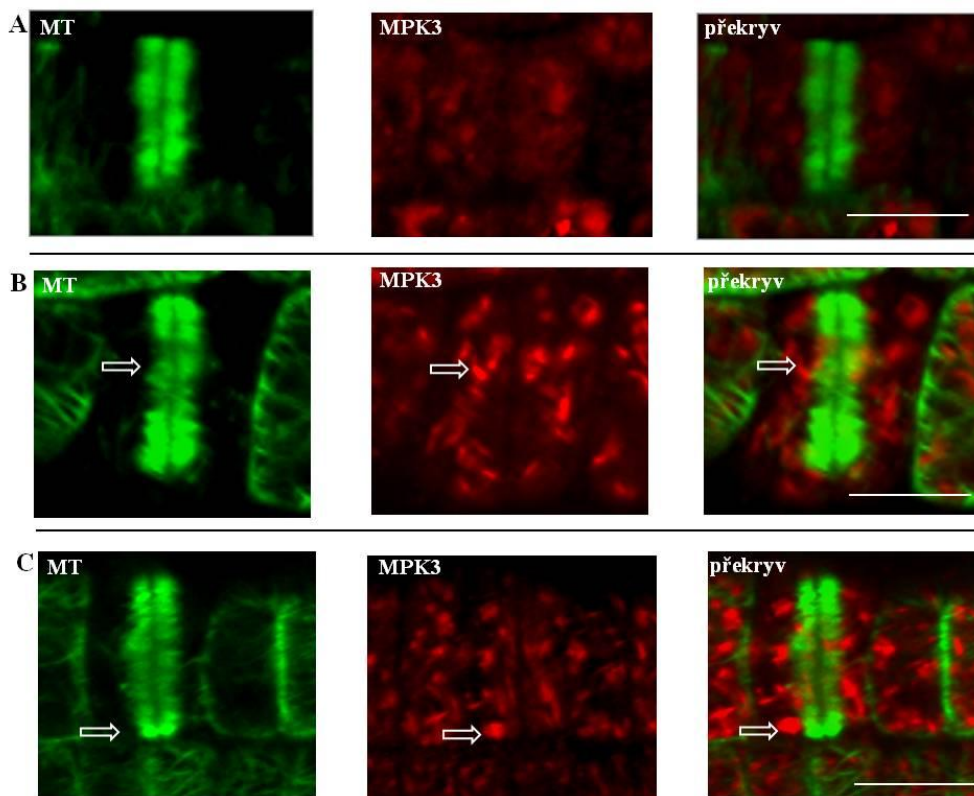
Obr. 35 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#11 ve stádiu anafáze. Lokalizace proteinu MPK3 v blízkosti mitotického vřeténka (hvězdičky) v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Měřítka 10 μm .

V průběhu cytokineze byl protein MPK3 u Col-0 lokalizován ve spotech, které byly přítomné v blízkosti MT fragmoplastu. Kromě vnitřní strany rozšiřujícího se cirkulárního fragmoplastu byly tyto spoty pozorovány i na periferii v blízkosti (-) konců MT fragmoplastu (Obr. 36A, B). Po působení Zn^{2+} se asociace spotů MPK3 s (-) konci MT fragmoplastu zintenzivnila (Obr. 36C). V buňkách linií s expresí SIMKK-YFP byla

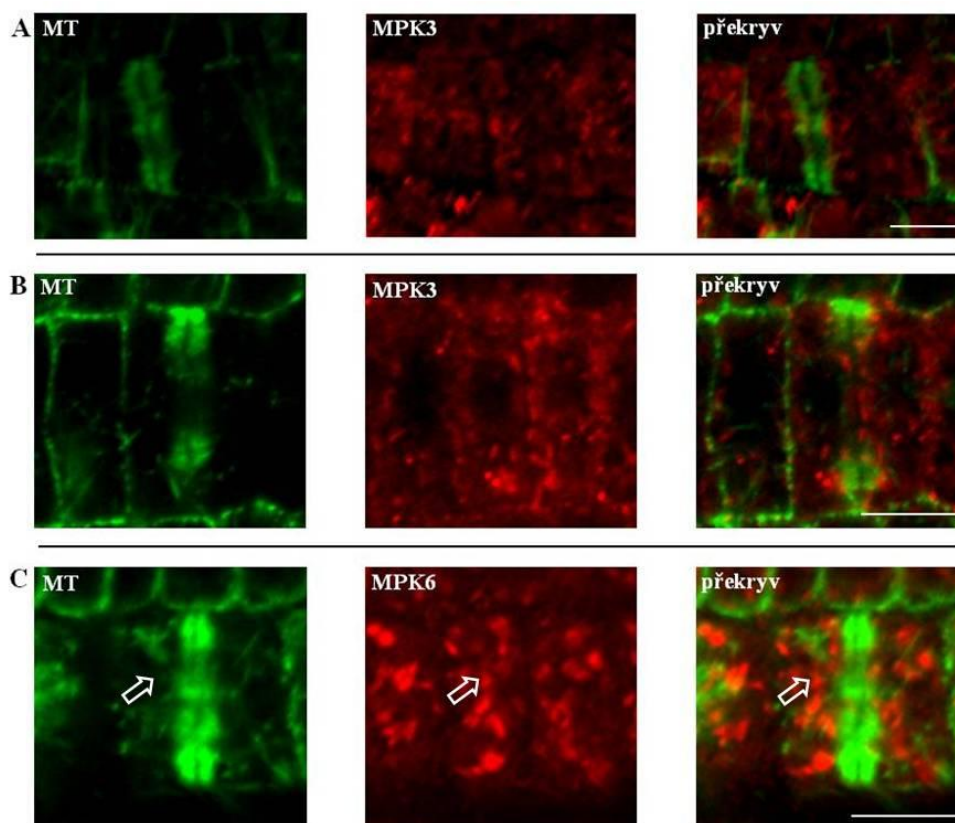
lokalizace MPK3 v průběhu cytokineze podobná, docházelo tedy k asociaci MPK3 s periferií fragmoplastu. Lokalizace u SIMKK-YFP#4 v kontrolních podmínkách závisela od způsobu přípravy preparátů. V kontrole s přímou fixací rostlin byly spoty MPK3 relativně malé a jejich asociace s MT fragmoplastu byla slabá (Obr. 37A). V kontrolních preparátech, které byly před fixací zalité kontrolním médiem, se výrazné spoty MPK3 už ale diferencovali, a jejich asociaci s (-) koncem MT fragmoplastu už bylo možné detekovat (Obr. 37B). Po ovlivnění Zn^{2+} byla prostorová asociace větších spotů MPK3 s periferií fragmoplastu zcela nápadná (Obr. 37C). U linie SIMKK-YFP#11 byly také pozorovány spoty MPK3 v blízkosti fragmoplastu a stejně jako v případě kontrolních semenáčků Col-0, tyto spoty byly po zalití kontrolním médiem intenzivnější v porovnání s přímou fixací (Obr. 38A, B). Po ovlivnění Zn^{2+} byla jejich intenzita ještě vyšší, což bylo provázeno jejich zvýšenou asociací s periferií fragmoplastů (Obr. 38C).



Obr. 36 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermálních buňkách rostlin Col-0 v průběhu cytokineze. Lokalizace proteinu MPK3 nahromaděného v malých spotech v těsné blízkosti fragmoplastu po přímé fixaci rostlin (A), po přelití kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Velké a intenzivně značené spoty v těsné blízkosti fragmoplastu jsou označeny šipkou (C). Měřítko 10 μ m.

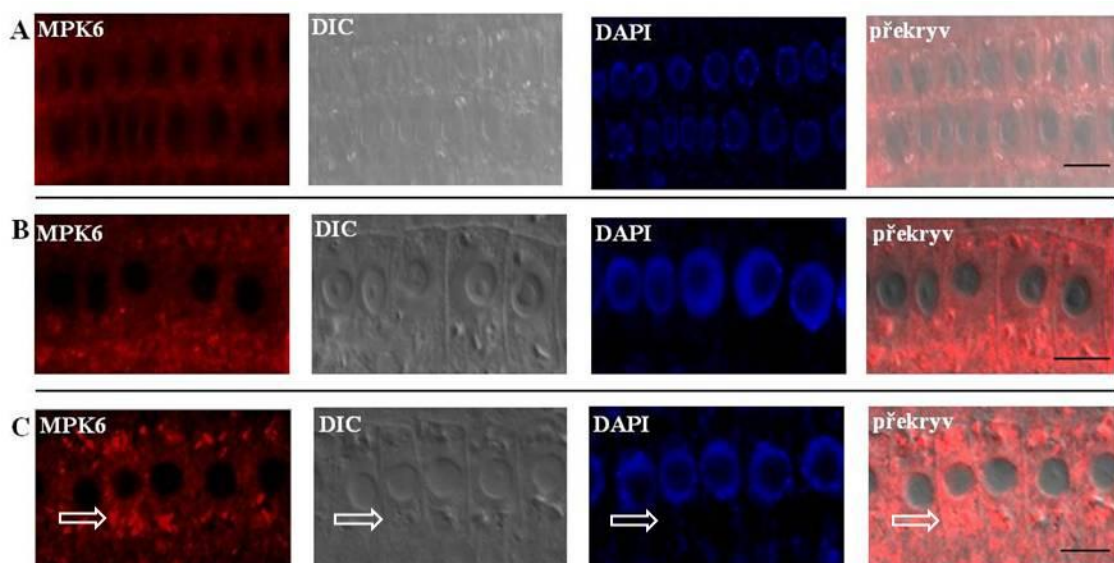


Obr. 37 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#4 v průběhu cytokineze. Lokalizace proteinu MPK3 nahromaděného v malých spotech v těsné blízkosti fragmoplastu po přímé fixaci rostlin (A), po přelití kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Velké a intenzivně značené spoty v těsné blízkosti fragmoplastu jsou označeny šipkou (B, C). Měřítko 10 μm .

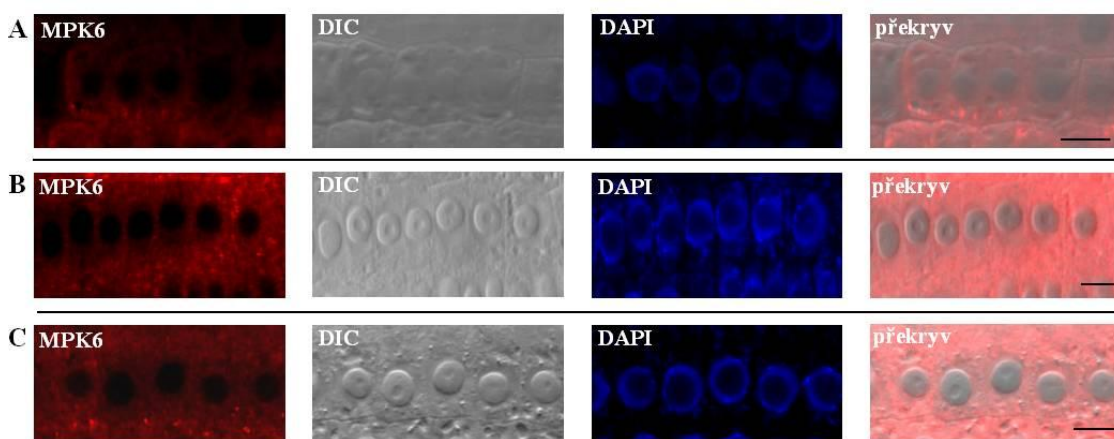


Obr. 38 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK3 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#11 v průběhu cytokineze. Lokalizace proteinu MPK3 nahromaděného v malých spotech v těsné blízkosti fragmoplastu po přímé fixaci rostlin (A), po přelití kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Velké a intenzivně značené spoty v těsné blízkosti fragmoplastu jsou označeny šipkou (C). Měřítka 10 μm .

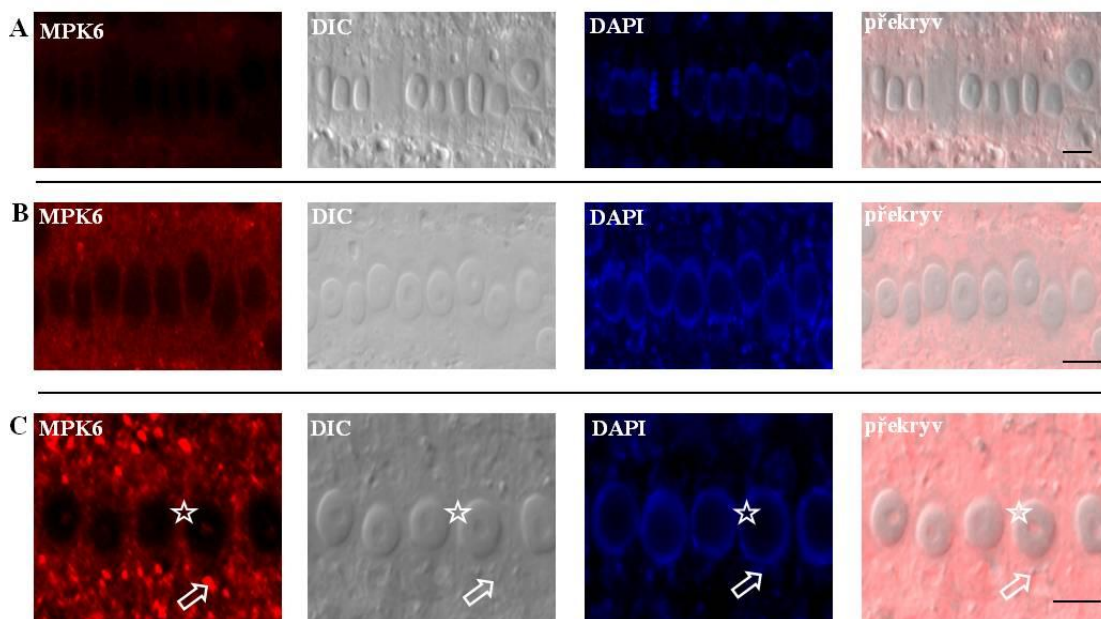
Protein MPK6 byl lokalizován v interfázních buňkách fixovaných kontrol u všech linií v cytoplasmě. V jádře se vyskytoval jen omezeně, jádérko bylo negativní a nebyl zaznamenán ani výskyt MPK6 ve spotech v cytoplasmě (Obr. 39A, 40A, 41A). V buňkách kontrol po zalití médiem (Obr. 39B, 40B) a po ovlivnění Zn^{2+} (Obr. 39C, 40C) docházelo k akumulaci MPK6 ve spotech v cytoplasmě u Col-0 a SIMKK-YFP#4. Spoty v buňkách Col-0 byly intenzivněji značené, a také větší než u linie SIMKK-YFP#4. Spoty s akumulací MPK6 se tvořili i u linie SIMKK-YFP#11, přičemž po Zn^{2+} stresu nabývali na velikosti, a objevovala se lokalizace MPK6 v jádru (Obr. 41C). Už po zalití rostlin kontrolním médiem (Obr. 39B, 40B, 41B), ale hlavně po stresu se Zn^{2+} docházelo k mírnému zvyšování přítomnosti MPK6 v jádrech (Obr. 39C, 40C, 41C).



Obr. 39 Lokalizace MPK6 v interfázních epidermálních buňkách v meristematické zóně kořene Col-0. Lokalizace proteinu MPK6 po přímé fixaci rostlin (A), po zalití rostlin kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Šipky označují intenzivně značené spoty v cytoplasmě (C). Měřítka 10 μm .

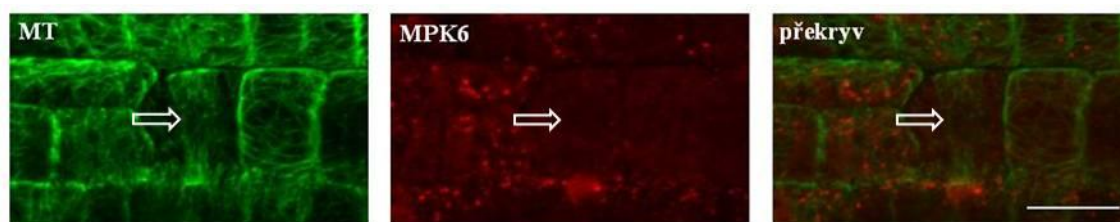


Obr. 40 Lokalizace MPK6 v interfázních epidermálních buňkách v meristematické zóně kořene linie SIMKK-YFP#4. Lokalizace proteinu MPK6 po přímé fixaci rostlin (A), po zalití rostlin kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Po zalití rostlin kontrolním médiem anebo médiem s obsahem $5 \text{ mmol.l}^{-1} Zn^{2+}$ po dobu 30 min došlo k akumulaci MPK6 do cytoplasmatických spotů (B, C). Měřítka 10 μm .

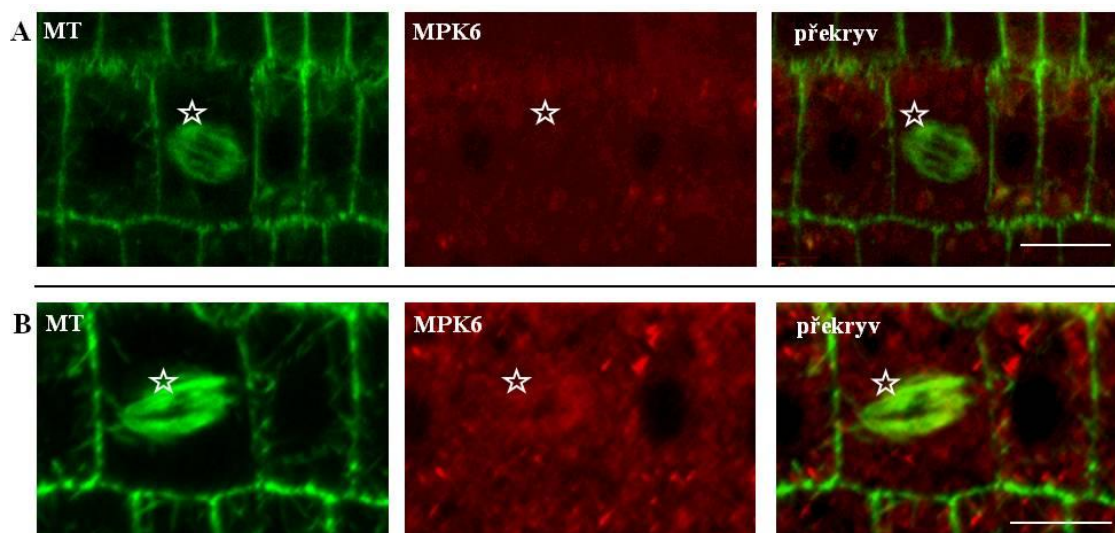


Obr. 41 Lokalizace MPK6 v interfázních epidermálních buňkách v meristematické zóně kořene linie SIMKK-YFP#11. Lokalizace proteinu MPK6 po přímé fixaci rostlin (A), po zalití rostlin kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Šipky označují intenzivně značené spoty v cytoplasmě a hvězdička označuje značení MPK6 v jádru (C). Měřítko 10 μm .

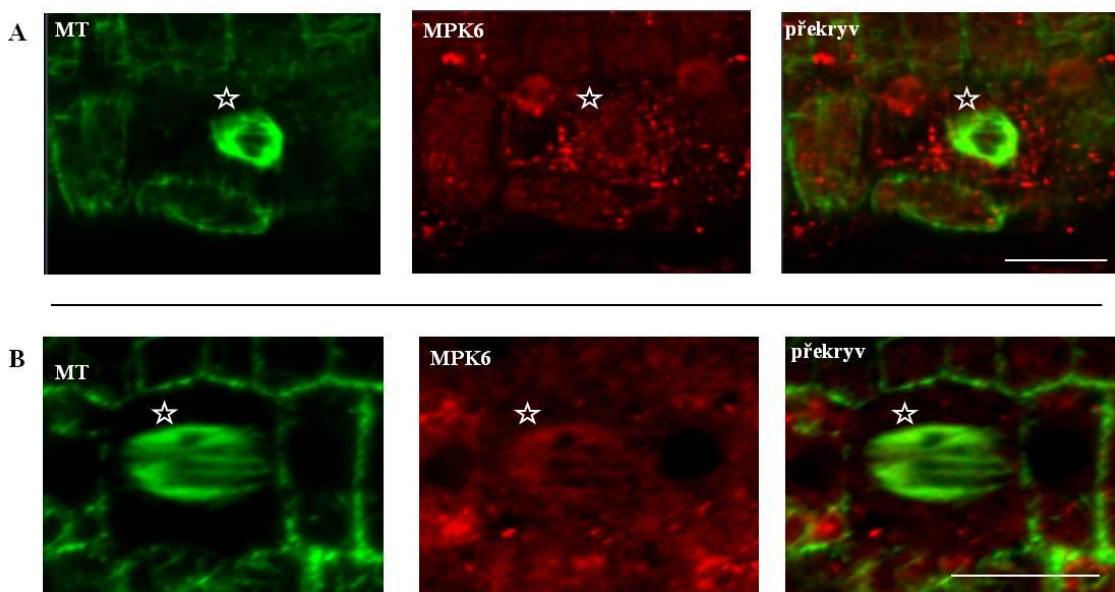
Ve stádiu předprofázy, kdy bylo už zřetelně formováno PPB, nebyla speciální asociace MPK6 s touto mikrotubulární strukturou pozorována (Obr. 42). Lokalizace MPK6 v mitotickém vřeténku v kontrolních podmínkách nebyla příliš výrazná (Obr. 43A, 44A, 45A), u rostlin ovlivněných Zn^{2+} se asociace MPK6 s mitotickým vřeténkem mimo SIMKK-YFP#11 (Obr. 45B) výrazně zvýšila (Obr. 43B, 44B). Asociace MPK6 s MT mitotického vřeténka po působení Zn^{2+} byla nejsilnější u SIMKK-YFP#4 (Obr. 43B).



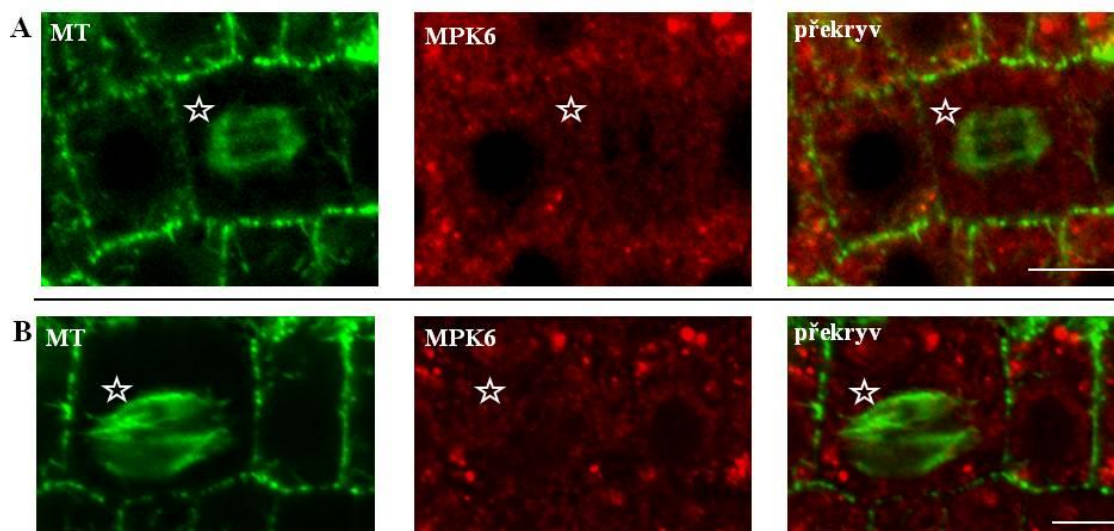
Obr. 42 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK6 v epidermální buňce rostliny Col-0 před vstupem do buněčného dělení v kontrolních podmínkách. Pozice předprofázního svazku MT (PPB) je vyznačena šipkou. Měřítko 10 μm .



Obr. 43 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK6 v epidermálních buňkách rostlin Col-0 ve stádiu anafáze. Lokalizace proteinu MPK6 v blízkosti mitotického vřeténka (hvězdičky) v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Měřítko 10 μm .

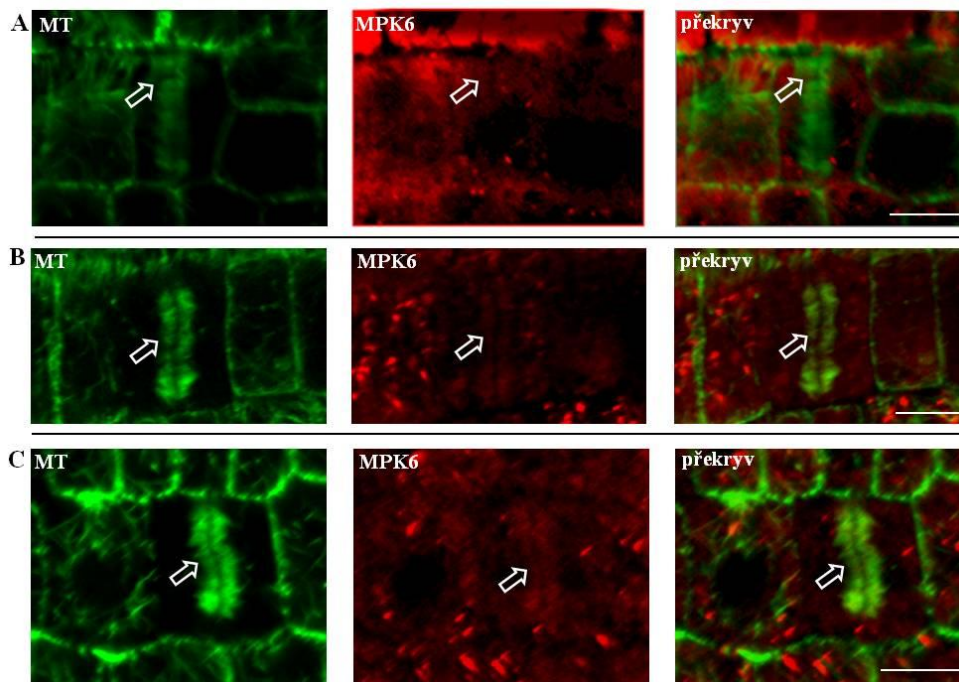


Obr. 44 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK6 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#4 ve stádiu anafáze. Lokalizace proteinu MPK6 v blízkosti mitotického vřeténka (hvězdičky) v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Měřítko 10 μm .

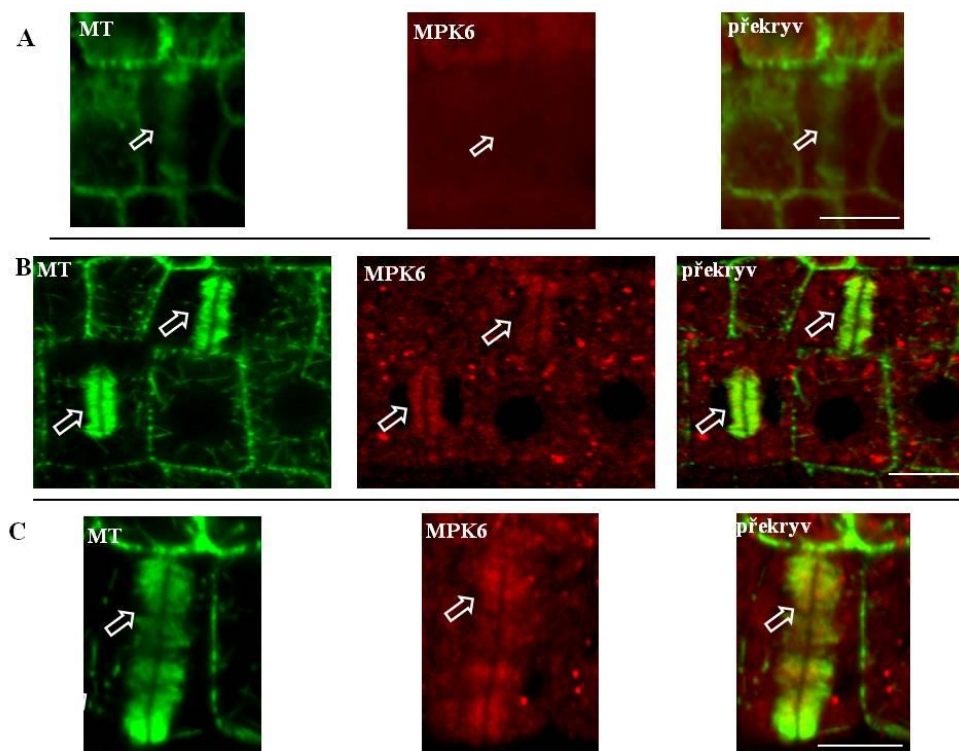


Obr. 45 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK6 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#11 ve stádiu anafáze. Lokalizace proteinu MPK6 v blízkosti mitotického vřetenka (hvězdičky) v kontrolních podmínkách (A) a po ovlivnění Zn^{2+} (B). Měřítka 10 μm .

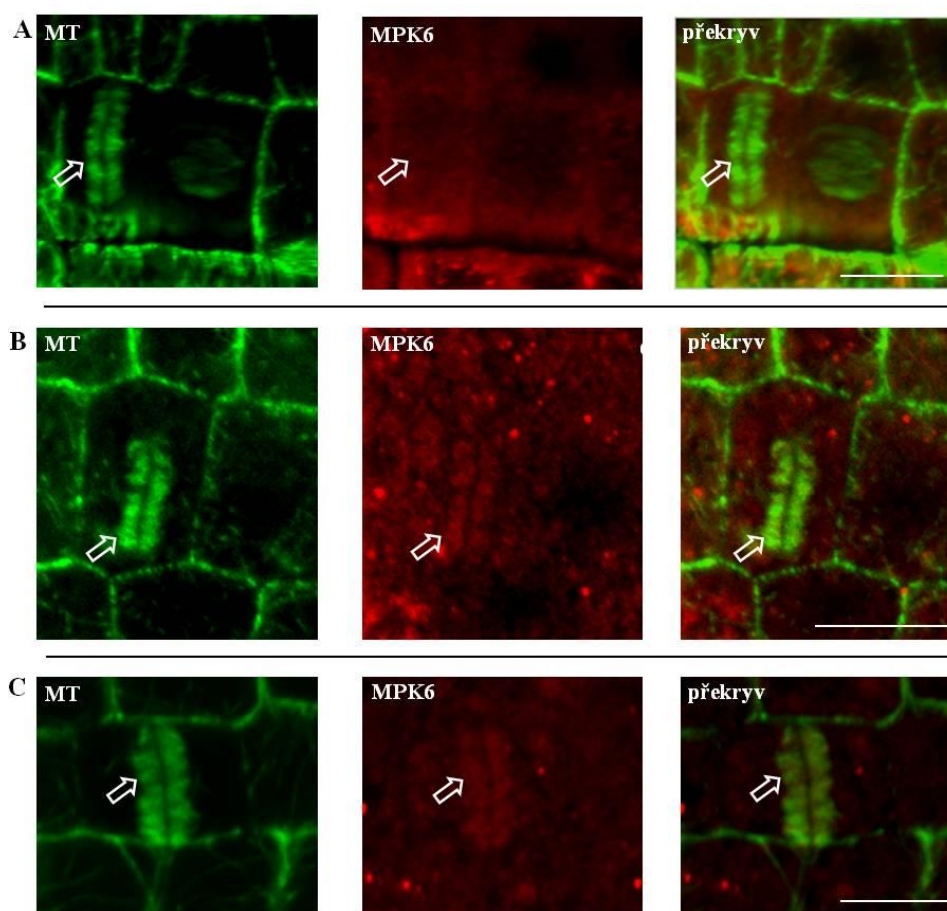
Nejvýraznější asociace MPK6 s MT v různých fázích buněčného dělení byla zaznamenána ve fragmoplastech. Tato asociace byla zřetelná u všech linií. Po přímé fixaci kořenů byla sice relativně slabá (Obr. 46A, 47A, 48A), po zalití kontrolním médiem ale tato asociace zesílila (Obr. 46B, 47B, 48B). U rostlin po stresu způsobeném Zn^{2+} MPK6 kolokalizovala s MT fragmoplastu po celé jejich délce (Obr. 46C, 47C, 48C). V buňkách transgenních linií s expresí SIMKK-YFP#4 (Obr. 47) a SIMKK-YFP#11 (Obr. 48) byla asociace MPK6 s MT fragmoplastu signifikantně silnější, než u kontrolních rostlin Col-0 (Obr. 46).



Obr. 46 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK6 v epidermálních buňkách rostlin Col-0 v průběhu cytokineze. Lokalizace proteinu MPK6 v asociaci s MT fragmoplastu po přímé fixaci rostlin (A), po přelití kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Fragmoplast a lokalizace kinasy v něm jsou označeny šipkou. Měřítka 10 μm .



Obr. 47 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK6 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#4 v průběhu cytokineze. Lokalizace proteinu MPK6 v asociaci s MT fragmoplastu po přímé fixaci rostlin (A), po přelití kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Fragmoplast a lokalizace kinasy v něm jsou označeny šipkou. Měřítka 10 μm .



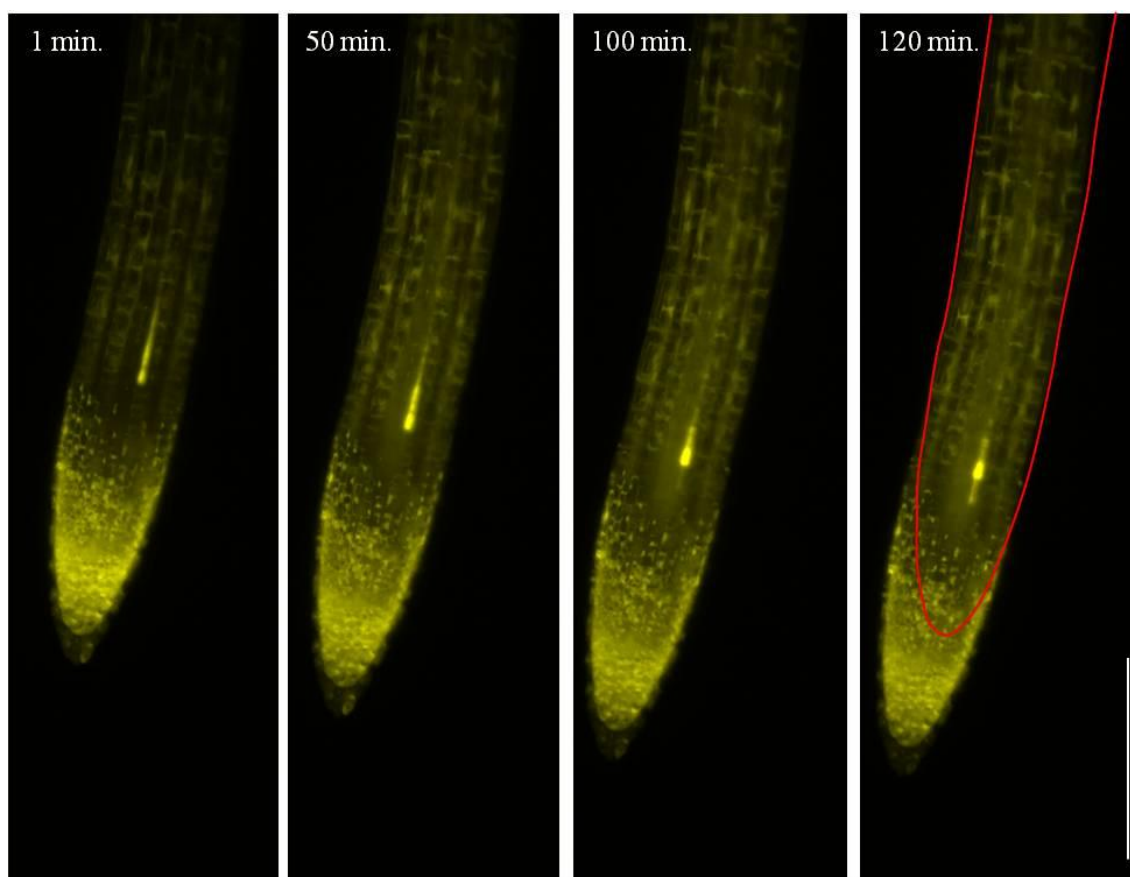
Obr. 48 Detail lokalizace mikrotubulů a MPK6 v epidermálních buňkách rostlin linie SIMKK-YFP#11 v průběhu cytokineze. Lokalizace proteinu MPK6 v asociaci s MT fragmoplastu po přímé fixaci rostlin (A), po přelití kontrolním médiem (B) a po ovlivnění Zn^{2+} (C). Fragmoplast a lokalizace kinasy v něm jsou označeny šipkou. Měřítka 10 μm .

4.5 Optimalizace přípravy preparátů transgenních rostlin pro light-sheet mikroskopii

Light-sheet fluorescenční mikroskopie je nová neinvazivní metoda umožňující šetrné a dlouhodobé studium celých rostlin v podmínkách, které jsou blízké přirozenému prostředí, ve kterém je rostlina zvyklá růst. Jedná se o typ mikroskopie s tenkou rovinou osvětlování (single plane illumination), s možností 3D zobrazení preparátů. Při přípravě preparátů pro tuto mikroskopickou metodu byly využity rostliny transgenních linií SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11, které nejprve rostly 2 d na pevném $\frac{1}{2}$ MS médiu bez vitamínů ve vodorovné poloze. Posléze byly pomocí pístu precizně přemístěny z média do tenké kapiláry a umístěny v mikroskopu. Parametry v mikroskopu byly nastaveny k optimální excitaci a emisi YFP a rostliny byly pozorovány v průběhu 60-120 min. Při vpravování semenáčků do kapilár bylo nezbytné dbát maximální opatrnosti, protože sebemenší poškození rostlin rapidně zastavuje růstu kořene a

kořenových vlásků, které jsou obzvláště velmi citlivé k sebemenšímu mechanickému poškození.

Růst kořene linie SIMKK-YFP#11 v průběhu 120 min při kontinuálním snímání (Obr. 49) dokumentuje vhodnost této metody ke studiu růstových a vývojových procesů u rostlin. V průběhu snímané periody došlo k nárůstu délky kořene o 72,214 μm (Tab. 5). Růst kořenových vlásků linie SIMKK-YFP#11 je zobrazen na Obr. 50. Celkový nárůst délky sledovaného kořenového vlásku během 70 min pozorování činil 18,925 μm (Tab. 6). Na Obr. 51 je zachycen pohyb jádra v nerostoucí kořenové buňce linie SIMKK-YFP#4 v průběhu 1 h pozorování.

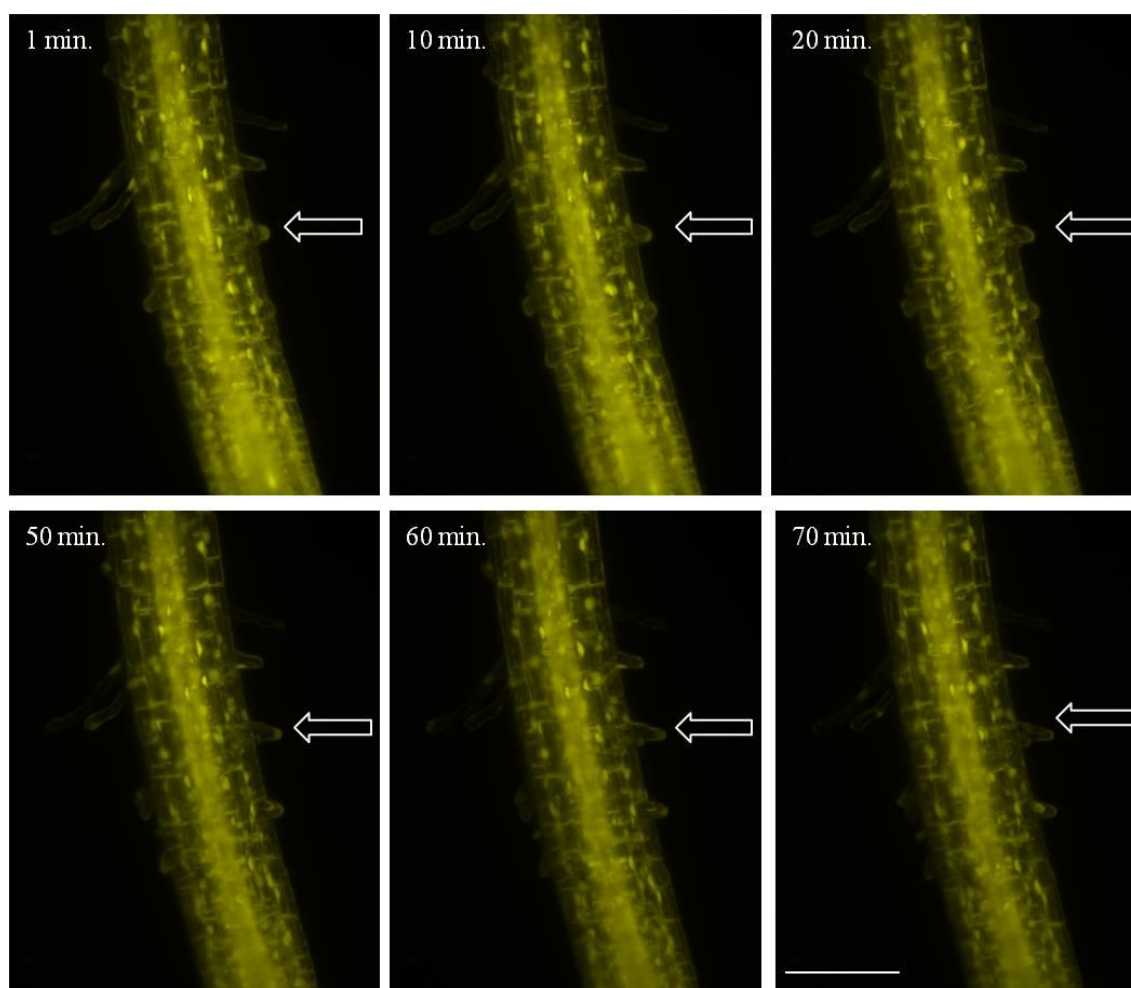


Obr. 49 Sekvenční série snímků rostoucího primárního kořene transgenní linie SIMKK-YFP#11, pozorovaného v light-sheet mikroskopu. Růst kořene byl snímán v tuhém médiu v kontrolních podmínkách v průběhu 120 min. Červenou linií je na posledním obrázku zobrazena pozice kořene na počátku pozorování (v čase 1 min). Měřítka 100 μm .

Tab. 5 Přírůstek kořene linie SIMKK-YFP#11, pozorovaného v průběhu 120 min v kontrolních podmínkách. Přírůstky byly měřeny v časových intervalech, zobrazených na Obr. 49.

min pozorování	přírůstek kořene (μm)
1 min	0
50 min	32,541
100 min	26,493
120 min	13,180

Celkový přírůstek kořene po 120 min: 72,214 μm .

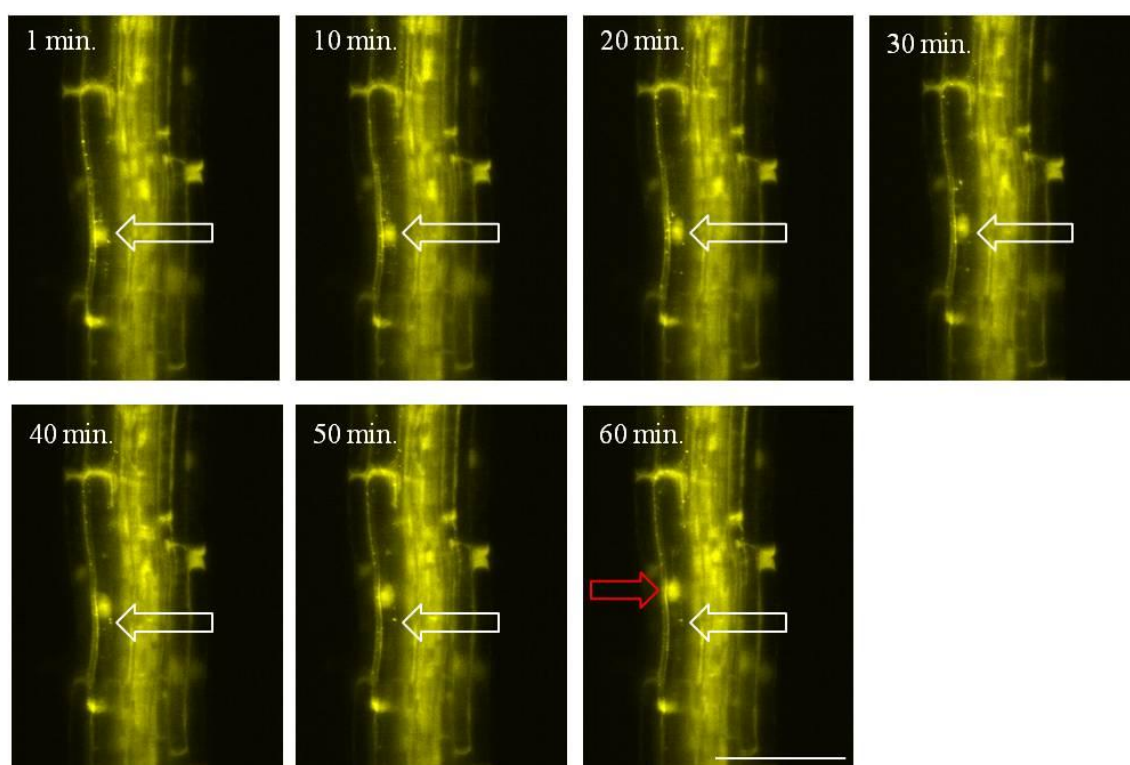


Obr. 50 Sekvenční série snímků rostoucího kořenového vlásku (šipka) linie SIMKK-YFP#11, pozorovaného v light-sheet mikroskopu. Kořen byl snímán v tuhém médiu v kontrolních podmínkách v průběhu 70 min. Měřítka 100 μm .

Tab. 6 Přírůstek kořenového vlásku linie SIMKK-YFP#11, pozorovaného v průběhu 70 min v kontrolních podmínkách. Přírůstky byly měřeny v časových intervalech, zobrazených na Obr. 50.

min pozorování	přírůstek kořenového vlásku (μm)
1 min	0
10 min	5,436
20 min	1,322
50 min	6,972
60 min	3,422
70 min	1,773

Celkový přírůstek kořenového vlásku po 70 min: 18,925 μm .



Obr. 51 Sekvenční série snímků pohybu jádra v epidermální buňce kořene linie SIMKK-YFP#4, pozorovaného v light-sheet mikroskopu. Bílá šipka znázorňuje pozici jádra v buňce v čase 1 min, červená šipka znázorňuje pozici jádra v buňce po 60 min pozorování. Měřítko 100 μm .

5. DISKUZE

Úroveň vnímání vnějších podnětů, průběh stresových reakcí a způsob odpovědí na daný stres je u rostlin závislý na jejich adaptačních schopnostech. Při potenciaálních hrozbách, které těžké kovy v přírodě představují, je důležité, aby koncentrace iontů kovů byla v rostlině udržována na relativně nízkých úrovních a v rovnováze. U různých rostlin je schopnost tolerovat působení zvýšených koncentrací těžkých kovů různá. Modelový druh *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. v půdách bohatých na těžké kovy neroste. U tohoto druhu byla popsána jenom základní buněčná tolerance k Zn^{2+} , zvýšené koncentrace Zn^{2+} netoleruje ani Zn^{2+} neakumuluje (Becher *et al.*, 2004; Arrivault *et al.*, 2006). V našich experimentech bylo zjištěno, že růstové a vývojové procesy testovaných rostlin *A. thaliana* divokého typu, ale i transgenních linií s expresí kontrolních (pMAT-GFP, GFP5) nebo funkčních (SIMKK-YFP) proteinů jsou zvýšenými koncentracemi Zn^{2+} ovlivněny. Vysoké aplikované koncentrace Zn^{2+} (1 mmol.l^{-1} a 5 mmol.l^{-1}) měly zásadní dopad na růst primárního kořene (Obr. 10), formování a růst bočních kořenů (Obr. 12) a kořenových vlásků (Obr. 8). Tyto výsledky korespondují s publikovanými závěry, že takto vysoké koncentrace Zn^{2+} mají významný vliv na růst a vývoj semenáčků *A. thaliana* (Kenderešová *et al.*, 2012).

Při signalizaci různých stresových faktorů, ve stresových reakcích rostlin a při modulaci různých vývojových procesů, má důležitou roli signální kaskáda mitogen-aktivovaných protein kinas. V rámci dobře charakterizované signální kaskády u *Medicago sativa* L. bylo zjištěno, že SIMKK je specifický aktivátor SIMK v odpovědi na solný stres (Kiegerl *et al.*, 2000). S aktivací kinasového modulu úzce souvisí i změny lokalizace v buňce. V kontrolních podmínkách se SIMKK nachází v jádře a v cytoplasmě (Obr. 15), v souladu s nejnovějšími publikovanými daty (Ovečka *et al.*, 2014). Po aplikaci solného stresu jsme zaznamenali relokaci fluorescenčně tagované SIMKK do cytoplasmy a též specificky do cytoplasmatických spotů. Tento fakt byl prokázán u rostlin linie 11 s nadprodukcí SIMKK-YFP. U linie SIMKK-YFP#4 k tak zřetelné relokaci SIMKK-YFP do cytoplasmatických spotů nedocházelo. Tento rozdíl může být částečně způsoben úrovní nadprodukce transgenů v linii SIMKK-YFP#4, která byla při porovnání s linií SIMKK-YFP#11 prokázána (Ovečka *et al.*, 2014). K relokaci SIMKK-YFP z jádra u této linie sice docházelo, ale při vysoké nadprodukcii nemusí docházet k aktivaci celého poolu kinasy. Rozdíly v chování z důvodu různé úrovně exprese jsme potvrdily i tím, že linie SIMKK-YFP#4 a SIMKK-YFP#11

reagovaly různou mírou tolerance vůči aplikovaným stresům. Jistý vliv na konečné chování buňky může mít i silná plazmolýza kořenových buněk způsobená vysokou koncentrací NaCl. Vysoké koncentrace Zn^{2+} (5 mmol.l-1 Zn^{2+}) také spouštěli relokaci SIMKK-YFP do cytoplasmatických spotů, což bylo potvrzeno u obou SIMKK-YFP linií. Navíc, počet těchto spotů značených SIMKK-YFP se se vzrůstajícím časem zvyšoval.

Ovlivnění schopnosti reagovat na externí signály z důvodu aktivace kinasy, která je v buňkách v nadbytku z důvodu řízené nadprodukce může vést i ke změnám v dynamice procesů, které jsou v interakci buněk s okolím velice důležité, jako je endocytóza. Ke studiu transportu membránových váčků, endocytózy samotné a k identifikaci buněčných vezikulárních organel v živých buňkách je v posledních letech s úspěchem využíváno barvení rostlin lipofilním barvivem FM4-64. Po obarvení buněk tímto vitálním barvivem je možné sledovat plasmatickou membránu a prostřednictvím mapování distribuce tohoto barviva v buňkách i efektivitu endocytózy. Nejdůležitějšími parametry jsou značení časných a následně pozdních endozomů, jejich distribuce v buňce a transport značených membrán do cílových kompartmentů v buňce. Internalizace barviva FM4-64 do endozomů byla u SIMKK-YFP linií pomalejší než v případě kontrolních rostlin, což může být způsobeno úrovní nadprodukce transgenů v těchto liniích. Zvýšené koncentrace Zn^{2+} měli zásadní vliv na barvení endozomů u SIMKK-YFP linií. Zn^{2+} snižoval rychlost barvení endozomů u obou linií, ovšem u linie SIMKK-YFP#11 docházelo po dlouhodobějším mikroskopování ke znatelnému zvýšení počtu endozomů pozitivních na FM4-64 než u linie SIMKK-YFP#4. Tato situace může být opět vysvětlena úrovní nadprodukci transgenů, která je u linie SIMKK-YFP#4 vyšší než u SIMKK-YFP#11.

Aktivace MAPK kaskád u rostlin je studována i v souvislosti s procesem buněčného dělení. Zapojení MPK6 do regulace buněčného dělení u *Arabidopsis* bylo detailně popsáno (Müller *et al.*, 2010). MPK6 je v kořenových buňkách lokalizovaná v TGN a na plasmatické membráně, a v procesu buněčného dělení byla popsána její lokalizace v PPB a fragmoplastu. MPK6 se přitom může akumulovat v malých vezikulárních útvarech (spotech), které jsou těsně asociovány s mikrotubuly PPB a fragmoplastu v buňkách kořenových špiček *A. thaliana* (Müller *et al.*, 2010). MPK6 je aktivovaná různými environmentálními stresy (Ichimura *et al.*, 2000). V souvislosti se stresem vyvolaným těžkými kovy u *Arabidopsis*, zvýšená koncentrace Cd^{2+} způsobuje v kořenech akumulaci ROS, co přímo vede k aktivaci MPK3 a MPK6 (Liu *et al.*, 2010).

Naše výsledky potvrdili lokalizaci MPK6 ve fragmoplastu v dělicích se buňkách kontrolních i transgenních linií, přičemž tato asociace byla Zn^{2+} stresem značně intenzifikována (Obr. 46, 47, 48).

Zapojení MPK3 v procesu buněčného dělení nebylo doposud zcela uspokojivě objasněno. Z dosavadních studií vyplývá, že je MPK3 důležitá v reakci rostlin na spektrum biotických a abiotických stresových faktorů a v rámci aktivované signalizační kaskády fosforyluje různé transkripční faktory, např. AZ1 (Pitzchke *et al.*, 2014), MYB44 (Persak a Pitzchke, 2012), WRKY33 (Mao *et al.*, 2011) nebo HSFA4A (Pérez-Salamó *et al.*, 2014). Guan *et al.*, 2014 zjistili, že se MPK3 účastní reakcí na stres v pylových láčcích *A. thaliana*. Z našich výsledků vyplývá důležité zjištění, že MPK3 je u kontrolních linií po přímé fixaci rostlin lokalizována v cytoplasmě, jádře i jádérku (Obr. 28). Při podmínkách, které jsou považovány za adekvátní kontrolu k aplikaci stresových faktorů (včetně Zn^{2+}), co je zalití kořenů rostlin tekutým médiem bez stresového faktoru, byla MPK3 v buňkách linií s expresí SIMKK-YFP lokalizována jen v cytoplasmě. Po aplikaci Zn^{2+} byla MPK3 navíc lokalizována v cytoplasmatických spotech. Stejně tak po zalití semenáčků kontrolním médiem byla MPK6 více lokalizovaná ve fragmoplastu dělicích se buněk. Porovnání lokalizace MPK6 v buňce v podmínkách přímé fixace rostlin a fixace po použití kontrolního média dále potvrzuje hypotézu, že zalití rostlin kontrolním médiem působí na rostliny jako stres, který může stav kinas ovlivnit. Kontrolní situace pro distribuci MPK3 a MPK6 v buňkách kořene je tedy pravděpodobně výrazně ovlivněna způsobem aplikace kontrolních podmínek. Kromě prvních fází fixace, i aplikace kontrolního média může s aktivitou MAPK interagovat, což může být vysvětleno mírným osmotickým nebo mechanickým stresem, a posléze i samotnou aktivací kinas.

Aplikací metod buněčné biologie byly získány informace, které rozšířili náš pohled na komplexnost MAPK signalizace u *Arabidopsis*. Úspěšně byla otestována i nová metoda mikroskopie, light-sheet mikroskopie, která umožňuje dlouhodobé pozorování celých rostlin v reálném čase s využitím 3D zobrazení. Tento typ mikroskopie poskytuje náhled na buňky s vysokým rozlišením v podmínkách, které jsou velmi blízké přirozenému prostředí, ve kterém rostliny v laboratorních podmínkách rostou. Tato inovativní mikroskopická metoda v budoucnu umožní získat detailnější a komplexnější základní data pro výzkum nejen signálních funkcí MAPK, ale i cytoskeletu a vezikulárního transportu při stresových odpovědích rostlin.

Znečištění životního prostředí těžkými kovy je v dnešním světě aktuální problém, který vyžaduje účinné řešení. Příjem, transport a distribuce těžkých kovů v rostlinách je zajímavou a dynamicky se rozvíjející oblastí rostlinné biologie. Na buněčné úrovni existuje celá řada specifických přenašečů zodpovědných za udržování homeostázy iontů v rostlinách, včetně iontů kovových. Pokud budou prostudovány mechanismy, kterými rostliny zabezpečují vylučování, kompartmentalizaci a distribuci těžkých kovů v rostlině, otevřou se nové možnosti pro využití těchto poznatků v různých biotechnologických aplikacích, včetně fytořemediace.

6. ZÁVĚR

V teoretické části byly shrnuty poznatky o signálních funkcích MAPK signalizaci zapojené do stresových reakcí rostlin, včetně reakcí na těžké kovy. Sumarizovány byly i základní informace o přenašečích, které jsou zapojeny v transportu těžkých kovů přes membrány rostlinných buněk.

V praktické části byl nejprve zjištěn vliv Zn^{2+} na vývoj a morfologii rostlin. Vysoké koncentrace Zn^{2+} působily jako negativní faktor ovlivňující celkový fenotyp rostlin. Bylo prokázáno, že transgenní linie s expresí SIMKK-YFP mají vyšší rezistenci k Zn^{2+} a nadprodukce transgenu v těchto rostlinách tak zřejmě celkově ovlivňuje jejich chování v přítomnosti těžkých kovů. Na buněčné úrovni způsobily vysoké koncentrace Zn^{2+} a NaCl relokaci SIMKK-YFP z jádra do cytoplasmy, kde se SIMKK-YFP akumulovala ve formě malých spotů. Po působení solného stresu došlo navíc k plazmolýze buněk. Ovlivnění Zn^{2+} vedlo u transgenních linií s expresí SIMKK-YFP ke zpomalení endocytózy a internalizace barviva FM4-64 do endozomálních kompartmentů. Ochranu rostlin před abiotickým stresem zprostředkovávají signální kaskády mitogenaktivovaných protein kinas (MAPK). V rámci této signalizační dráhy dochází po aktivaci stresovými faktory k fosforylaci výkonných proteinů, a tím k její aktivaci. Významné postavení v signálních kaskádách při abiotických stresech mají kinasy MPK3 a MPK6. Imunohistochemickou metodou whole mount byl pozorován vliv toxických koncentrací Zn^{2+} na distribuci těchto proteinů v kořenových buňkách testovaných rostlin. Samotný stres, který byl vyvolán aplikací Zn^{2+} měl vliv na lokalizaci těchto proteinů v interfázních buňkách kořene a v různých fázích buněčného dělení. Práce přispěla i k ověření nových možností studia signálních funkcí MAPK, které otevírá využití light-sheet mikroskopie. Velkou výhodou této nové metody snímání je možnost pozorování celých rostlin rostoucích v prostředí, které je pro ně přirozenější. V budoucích experimentech tak bude umožněno získat více informací o působení abiotických stresů na rostliny.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdel-Ghany S. E., Müller-Moule P., Niyogi K. K., Pilon M., Shikanai T. (2005): Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**, 1233-1251.
- Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brosche M., Schlichting R., Scheel D. and Kangasjarvi J. (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant Journal* **40**, 512-522.
- Arisz S. A., van Wijk R., Roels W., Zhu J. K., Haring M., Munnik T. (2013): Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Frontiers in Plant Science* **4**, doi: 10.3389/fpls.2013.00001.
- Arrivault S., Senger T., Krämer U. (2006): The *Arabidopsis* metal tolerance protein *AtMTP3* maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *Plant Journal* **46**, 861-879.
- Asai, T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Assunção A. G. L., Costa Martins P. D. A., De Folter S., Vooijs R., Schat H., Aarts M. G. M. (2001): Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* **24**, 217-226.
- Assunção A. G. L., Herrero E., Lin Y. F., Huettel B., Talukdar S., Smaczniak C., Immink R. G. H., Van Eldik M., Fiers M., Schat H. (2010): *Arabidopsis thaliana* transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* **107**, 10296-10301.
- Axelsen K. B., Palmgren M. G. (2001): Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 2696-2706.
- Bargmann B. O. R., Laxalt A. M., ter Riet B., van Schooten B., Merquiol E., Testerink Ch., Haring M. A., Bartels D., Munnik T. (2009): Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant and Cell Physiology* **50**, 78-89.
- Becher M., Talke I. N., Krall L., Krämer U. (2004): Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoot of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal* **37**, 251-268.
- Bergmann D. C., Lukowitz W., Somerville Ch. R. (2004): Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**, 1494-1497.
- Blaudez D., Kohler A., Martin F., Sanders D., Chalot, M. (2003): Poplar metal tolerance protein 1 (MTP1) confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell* **15**, 2911-2928.
- Cailliatte R., Lapeyre B., Briat J. F., Mari S., Curie C. (2009): The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal* **422**, 217-228.
- Cailliatte R., Schikora A., Briat J. F., Mari S., Curie C. (2010): High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for *Arabidopsis* Growth in Low Manganese Conditions. *Plant Cell* **22**, 904-917.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **14**, 703-711.
- Clemens S., Bloss T., Vess C., Neumann D., Nies D. H., zur Nieden U. (2002): A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 18215-18221.
- Colangelo E. P., Guerinot M. L. (2006): Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 322-330.

- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217-226.
- Curie C., Alonso J. M., Le Jean M., Ecker J. R., Briat J. F. (2000): Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal* **347**, 749-755.
- Delage E., Ruelland E., Guillas I., Zachowski A., Puyaubert J. (2012): *Arabidopsis* type-III phosphatidylinositol-4-kinases beta 1 and beta 2 are upstream of the phospholipase C pathway triggered by cold exposure. *Plant and Cell Physiology* **53**, 565-576.
- Delhaize E., Gruber B. D., Pittman J. K., White R. G., Leung H., Miao Y., Jiang L., Ryan P. R., Richardson A. E. (2007): A role for the *AtMTP11* gene of *Arabidopsis* in manganese transport and tolerance. *Plant Journal* **51**, 198-210.
- Desikan R., Hancock J. T., Ichimura K., Schinozaki K., Neill S. J. (2001): Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology* **126**, 1579-1587.
- Devoto A., Turner J. G. (2003): Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. *Annals of Botany* **92**, 329-337.
- Droillard M. J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H. and Lauriere C. (2002): Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Letters* **527**, 43-50.
- Droillard M. J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurière Ch. (2004): Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters* **574**, 42-48.
- Eren E., Argüello J. M. (2004): Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metaltransporting P(II)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiology* **136**, 3712-3723.
- Frye C. A., Tang D., Innes R. W. (2001): Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* **98**, 373-378.
- Gao Z., Chen Y. F., Randlett M. D., Zhao X. Ch., Findell J. L., Kieber J. J., Schaller G. E. (2003): Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 34725-34732.
- Guan Y., Lu J., Mc Clure B., Zhang S. (2014): Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, doi:10.1104/pp.113.231274.
- Gudesblat G. E., Iusem N. D. and Morris P. C. (2007): Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist* **173**, 713-721.
- Hall J. L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1-11.
- Hall J. L., Williams L. E. (2003): Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2601-2613.
- Hamel L. P., Nicole M. C., Sritubtim S., Morency M. J., Ellis M., Ehling J., Beaudoin N., Barbazuk B., Klessig D., Lee J., Martin G., Mundy J., Ohashi Y., Scheel D., Sheen J., Xing T., Zhang S., Seguin A. and Ellis B. E. (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Science* **11**, 192-198.
- Huang G. T., Ma S. L., Bai L. P., Zhang L., Ma H., Jia P., Zhong M., Guo Z. F. (2012): Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports* **39**, 969-987.
- Huang T. L., Huang H. J. (2008): ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead. *Chemosphere* **71**, 1377-1385.
- Huang Y., Li H., Hutchinson C. E., Laskey J., Kieber J. J. (2003): Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant Journal* **33**, 221-233.
- Chang L., Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**, 37-40.

- Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M. H., Ferjani E. E. (1997): Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* **127**, 139–147.
- Chen X. Z., Peng J. B., Cohen A., Nelson H., Nelson N., Hediger M. A. (1999): Yeast SMF1 mediates H⁺-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 35089-35094.
- Cheong Y. H., Kim M. Ch. (2010): Functions of MAPK Cascade Pathways in Plant Defense Signaling. *Journal of Plant Pathology* **26**, 101-109.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases AtMPK4 and AtMPK6. *The Plant Journal* **24**, 655-665.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J. C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Ishihama N., Yoshioka H. (2012): Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 431-437.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* **136**, 3276-3283.
- Kenderešová L., Staňová A., Pavlovkin J., Ďurišová E., Nadubinská M., Čiamporová M., Ovečka M. (2012): Early Zn²⁺-induced effects on membrane potential account for primary heavy metal susceptibility in tolerant and sensitive *Arabidopsis* species. *Annals of Botany* **110**, 445-459.
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology* **661**, 3-38.
- Khan M. N., Siddiqui M. H., Mohammad F., Naeem M. (2012): Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* **27**, 210-218.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan Ch., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hier H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell* **12**, 2247-2258.
- Kim S. H., Woo D. H., Kim J. M., Lee S. Y., Chung W. S., Moon Y. H. (2011): *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **412**, 150-154.
- Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* **97**, 2940-2945.
- Krämer U., Talke I. N., Hanikenne M. (2007): Transition metal transport. *FEBS Letters* **581**, 2263-2272.
- Krämer U. (2010): Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 517-534.
- Krysan P. J., Jester P. J., Gottwald J. R., Sussman M. R. (2002): An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* **14**, 1109-1120.
- Lanquar V., Lelievre F., Bolte S., Hames C., Alcon C., Neumann D., Vansuyt G., Curie C., Schroder A., Kramer U., Barbier-Brygoo H., and Thomine S. (2005): Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO* **24**, 4041-4051.
- Laohavisit A., Colaco R., Davies J. (2012): Cytosolic Ca(2+) determinations in studying plant responses to salinity and oxidative stress. *Methods in Molecular Biology* **913**, 163-171.
- Lin Y. F., Aarts G. M. M. (2012): The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 3187-3206.

- Liu X. F., Supek F., Nelson N., Culotta V. C. (1997): Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 11763-11769.
- Liu X.-M., Kim K. E., Kim K.-Ch., Nguyen X. C., Han H. J., Jung M. S., Kim H. S., Kim S. H., Park H. Ch., Yun D. - J., Chung W. S. (2010): Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* **71**, 614-618.
- Llamas A., Ullrich C. U., Sanz A. (2008): Ni²⁺ toxicity in rice: effect on membrane functionality and plant water content. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 905-910.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville Ch. (2004): A MAPKK kinase gene regulates extraembryonic cell fate in Arabidopsis. *Cell* **116**, 109-119.
- Madhava R. K. V., Sresty T. V. (2000): Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* **157**, 113-128.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives Biochemistry and Biophysics* **444**, 139-58.
- Mano S., Hayashi M., Nishimura M. (1999): Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *Plant Journal* **17**, 309-320.
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhang S. (2011): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 1639-1653.
- Mäser P., Thomine S., Schroeder J. I., Hirschi K., Ward J., Sze H., Amtmann A., Maathuis F. J. M., Talke I. N., Sanders D., Harper J. F., Tchieu J., Gribskov M., Persans M. W., Salt D. E., Guerinot M. L. (2001): Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**, 1646-1667.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K. I., Fukami Y., Kikkawa U., Yasuda T. (2002): Activation of AtMEK1, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant Journal* **29**, 637-647.
- Melikant B., Giuliani C., Halbmayr-Watzina S., Limmongkon A., Haberle-Bors E., Wilson C. (2004): The Arabidopsis thaliana MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS Letters* **576**, 5-8.
- Menguer P. K., Farthing E., Peaston K. A., Ricachenevsky F. K., Fett J. P., Williams L. E. (2013): Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2871-2883.
- Miles G. P., Samuel M. A., Ellis B. E. (2009): Suppression of MKK5 reduces ozone-induced signal transmission to both MPK3 and MPK6 and confers increased ozone sensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal and Behavior* **4**, 687-692.
- Miller G. A. D., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. O. N. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* **33**, 453-467.
- Mishra N. S., Tuteja R., Tuteja N. (2006): Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**, 55-68.
- Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. (2012): How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 118-25.
- Mizoguchi T., Iriet K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* **93**, 765-769.
- Montanini B., Blaudez D., Jeandroz S., Sanders D., Chalot M. (2007): Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BioMed Central Genomics*, doi: 10.1186/1471-2164-8-107.
- Müller J., Beck M., Mettlich U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes

- to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane *Plant Journal* **61**, 234–248.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–681.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 26959–26966.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathway in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **7**, 339–346.
- Nongpiur R., Soni P., Karan R., Singla-Pareek S. L., Pareek A. (2012): Histidine kinases in plants: cross talk between hormone and stress responses. *Plant Signaling and Behavior* **7**, 1230–1237.
- Opdenakker K., Remans T., Keunen E., Vangronsveld J., Cuypers A. (2012): Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environmental and Experimental Botany* **83**, 53–61.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO* **22**, 1282–1288.
- Ovečka M., Lang I., Baluška F., Ismail A., Illeš P., Lichtscheidl I. K. (2005): Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* **226**, 39–54.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Smékalová V., Luptovčíak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Skultety L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seeding susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/eru115.
- Paulsen L. T., Saier M. H. (1997): A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *Journal of Membrane Biology* **156**, 99–103.
- Pérez-Salamó I., Papdi C., Rigó G., Zsigmond L., Vilela B., Lumberras V., Nagy I., Horváth B., Domoki M., Darula Z., Medzihradszky K., Koncz C., Bögre L., Szabados L. (2014): The Heat Shock Factor HSFA4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the MAP kinases, MPK3 and MPK6. *Plant Physiology*, doi:10.1104/pp.114.237891.
- Persak H., Pitzschke A. (2013): Tight Interconnection and Multi-Level Control of *Arabidopsis* MYB44 in MAPK Cascade Signalling. *PLOS One*, doi:10.1371/journal.pone.0057547.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111–1120.
- Pitzschke A., Datta S., Persak H. (2014): Salt Stress in *Arabidopsis*: Lipid Transfer Protein AZI1 and Its Control by Mitogen-Activated Protein Kinase MPK3. *Molecular Plant* **7**, 722–738.
- Popescu S. C., Popescu G. V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S. P. (2009): MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes and Development* **23**, 80–92.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998): *Fyziologie rostlin*. 1 vyd., Academia, Praha, Česká republika, 484 stran.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621–649.
- Roelofs D., Aarts M. G. M., Schat H., Straalen N. M. (2008): Functional ecological genomics to demonstrate general and specific responses to abiotic stress. *Functional Ecology* **22**, 8–18.
- Sangwan V., Dhindsa R. S. (2002): *In vivo* and *in vitro* activation of temperature-responsive plant map kinases. *FEBS Letters* **531**, 561–564.
- Seigneurin-Berny D., Gravot A., Auroy P., Mazard C., Kraut A., Finazzi G., Grunwald D., Rappaport F., Vavasseur A., Joyard J., Richaud P., Rolland N. (2005): HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2882–2892.

- Shikanai T., Muller-Moule P., Munekage Y., Niyogi K. K., Pilon M. (2003): PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**, 1333-1346.
- Schützendübel A., Polle A. (2002): Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induces oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1351-1365.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Soyano T., Nishihama R., Morikiyo K., Ishikawa M., Machida Y. (2003): NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes and Development* **17**, 1055-1067.
- Supek F., Supekova L., Nelson H., Nelson N. (1997): Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. *Journal of Experimental Biology* **200**, 321-330.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavačka A., Lecourieux F., Meskiene I., Ichtscheidl I., Lernart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO* **21**, 3296-3306.
- Šamaj J., Baluška F., Hirt H. (2004): From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany* **55**, 189-98.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**, 140-148.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 805-818.
- Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. (2011): Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **41**, 649-660.
- Talke I. N., Hanikenne M., Krämer, U. (2006): Zinc dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* **142**, 148-167.
- Tang D., Innes R. W. (2002): Overexpression of a kinase-deficient form of the EDR1 gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **32**, 975-983.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**, 141-152.
- Thapa G., Sadhukhan A., Panda K. S., Sahoo L. (2012) Molecular mechanistic model of plant heavy metal tolerance. *BioMetals* **25**, 489-505.
- Thomine S., Wang R., Ward J. M., Crawford N. M., Schroeder J. I. (2000): Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4991-4996.
- Thomime S., Lelièvre F., Debarbieux F., Schroeder J. I., Barbier-Brygoo H. (2003): AtNRAMP3, multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant Journal* **34**, 685-695.
- Van der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E., Chardonens A. N., Schat H., Verkleij J. A. C., Hooykaas P. J. J. (1999): Over-expression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology* **119**, 1047-1055.
- Verret F., Gravot A., Auroy P., Preveral S., Forestier C., Vavasseur A., Richaud P. (2005): Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch. *FEBS Letters* **579**, 1515-1522.

- Wang J., Ding H., Zhang A., Ma F., Cao J., Jiang M. (2010): A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 442-452.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1-14.
- Woeste K. E., Kieber J. J. (2000): A strong loss-of-function mutation in *RAN1* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**, 443-455.
- Xiong L., Schumaker K. S., Zhu J. K. (2002): Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**, S165-S183.
- Ye Y., Li Z., Xing D. (2013): Nitric oxide promotes MPK6-mediated caspase-3-like activation in cadmium-induced *Arabidopsis thaliana* programmed cell death. *Plant, Cell and Environment* **36**, 1-15.
- Yeh C. M., Hsiao L. J., Huang H. J. (2004): Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1306-1312.
- Yoo S. D., Cho Y. H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**, 789-795.
- Zhu X., Feng Y., Liang G., Liu N., Zhu J. K. (2013): Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca²⁺ dynamics in *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant* **6**, 444-55.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ABC	ATP-vázající kazety
ANOVA	analýza rozptylu
ANP1/2/3	Arabidopsis NPK1-like protein kinasa
APX	askorbát peroxidasa
AZ1	lipid transfer protein (LTP)-related hybrid proline-rich protein
BSA	hovězí sérový albumin
BWMK1	blast/wound-induced MAP kinase 1
bZIP	basic region-leucine zipper
Ca ²⁺ -ATPasa	vápníková adenosin trifosfatasa
CAT	katalasa
CAX	cation exchanger family
CCC1	Ca ²⁺ -sensitive cross complementer 1
CDF	cation diffusion facilitator
cm	centimetr
Col-0	Columbia
COPT	putative Cu influx transporter
COT1	cobalt toxicity 1
CTR1	constitutive triple response 1
d	den
DAPI	4',6-diamin-2-fenylindol
DIC	diferential interference contrast
DMSO	dimethylsulfoxid
DPP	den po přeložení roslin
EDR1	enhanced disease susceptibility
EGTA	ethylenglykol- <i>bis</i> -(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina
E _M	membránový potenciál
ER	endoplasmatické retikulum
FM4-64	(N-(3-triethylammoniumpropyl)- 4-(8-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide)
FRD3	ferric reduktase defective 3
GA	Golgiho aparát
GFP	zelený fluorescenční protein
Glu	kyselina glutamová
GR	glutathion reduktasa
h	hodina
H ⁺ -ATPasa	protonová adenosin trifosfatasa
HMA	heavy metal ATPase
HsfA4A	heat stress transcription factor
IREG	iron-regulated protein family
IRT	iron-regulated transporter
JA	jasmonová kyselina
LSD	least significant difference
LSM	laserový skenovací mikroskop
MAP3K (MAPKKK, MEKK)	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
MAP4K (MAPKKKK)	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa kinasa kinasa
MAPK (MPK)	mitogen-aktivovaná protein kinasa
MAPK2 (MAPKK, MKK)	mitogen-aktivovaná protein kinasa kinasa
min	minuta
MMK	MAPK z <i>Medicago sativa</i>

MS-Médium	Murashige and Skoog Médium
MT	mikrotubuly
MTP	metal tolerance protein
MTSB	mikrotubuly stabilizační pufr
MYB	myelblastosis family of transcriptional factor
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	sodno/draselná adenosin trifosfatasa
NaCl	chlorid sodný
NO	oxid dusnatý
NPK	nukleus/phragmoplast-localized protein kinase
Nramp	Natural resistance associated macrophage protein
Ntf6	MAPK z <i>Nicotina benthamiana</i>
OMTK1	oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1
PA	fosfatidová kyselina
PAA1	P-tyt ATPase Arabidopsis
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	fosfátem tlumený solný roztok
PI	fosfatidylinositol
PIPES	piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová) kyselina
PM	plasmatická membrána
PPB	předprofázní svazek
RAN1	responsive to antagonist 1
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	salicylová kyselina
SAMK	stress-induced protein kinase
SIMK	salt-stress inducible protein kinase
SIMKK	salt-stress inducible protein kinase kinase
SIPK	salicylic acid-induced protein kinase
SOD	superoxid dismutasa
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TDY motiv	Thr-Ans-Tyr
TDY1	MAPK z <i>Medicago sativa</i>
TEY motiv	Thr-Glu-Tyr
TGN	trans golgi network
TM	transmembránový
WIPK	wound-induced protein kinase
WRKY 22/25/29/33	superrodina transcripčních faktorů
YFP	žlutý fluorescenční protein
YSL	yellow-stripe-1-like protein
ZAT12	zinkový prst (transcripční faktor)
ZHF	zinc homeostasis factor
ZIF1	zinc induced facilitator 1
ZIP	ZRT, IRT-like protein
ZRC1	zinc resistance conferring 1
ZRT	zinc-regulated transporter
ZTP1	zinc-tolerance protein