

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Matěj Drs

Role komplexu exocyst v dynamice stomat
Role of the exocyst complex in stomata dynamics

Diplomová práce

Školitel: Tamara Pečenková, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

13.8.2018

Podpis:

Poděkování:

Mnohokrát děkuji své školitelce Tamaře Pečenkové CSc. za vedení při práci a podporu ve chvílích, kdy se experimenty nedařili, za cenné rady, trpělivost, smích a častý odvoz z ústavu autem. Dále bych rád poděkoval Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D za ochotu zaučit mne pracovat s přístrojem Li-Cor. A Mgr. Evě Neuwirthové, která mi vždy vyšla vstříc, když jsem přístroj potřeboval. Dále bych rád poděkoval Mgr. Matyáši Fendrychovi Ph.D., který se uvolil propůjčit mi svou laboratoř pro měření. V neposlední řadě své rodině, jež mi umožnila věnovat se studiu.

Obsah

1	Seznam zkratk	8
2	Úvod a cíle práce	9
3	Současný stav poznání	10
4	Stomata	10
4.1	Vývoj stomat	10
4.2	Turgor	11
5	Regulace a dynamika stomat	12
5.1	Otevírání a zavírání stomat	13
5.2	Regulace stomat	14
5.2.1	Světlo a CO ₂	14
5.2.2	Kyselina abscisová	15
5.2.3	Kyselina salicylová a jasmonová	16
5.3	Dynamika membrán	17
5.3.1	Vliv cytoskeletu na dynamiku stomat	18
5.3.2	Buněčná stěna	20
6	Exocyst komplex	22
6.1	Role podjednotky EXO70B1 v buňkách pokožky a stomat	24
6.1.1	Autofagie a obrana před patogeny	24
6.1.2	Vliv Exo70B1 na stomata	25
6.2	Vliv podjednotky EXO70B2	26
7	Metodika	28
7.1	Rostlinný materiál	28
7.2	Kultivace rostlin	28
7.3	Vysoušecí experiment	29
7.4	Otisk epidermis	30
7.5	Měření konduktance stomat	30
7.6	Příprava preparátů pro kvantifikaci rozměrů stomat	31
7.6.1	Indukce zavírání v důsledku působení tmy	31
7.6.2	Mikroskopická analýza stomat	32
7.7	Příprava B1 GFP konstruktů	33

7.7.1	Izolace genomové DNA	33
7.7.2	PCR	33
7.7.3	Ligace a transformace <i>E. coli</i>	34
7.7.4	Přenesení vektoru do pGWB4 transformace <i>E. coli</i>	34
7.7.5	Tranformace <i>A. tumefaciens</i>	34
7.7.6	Transformace rostlin	35
8	Výsledky	36
8.1	Hustota průduchů	36
8.2	Vysoušecí experiment	37
8.3	Měření konduktance stomat	37
8.3.1	WT versus <i>exo70B1</i>	38
8.3.2	WT versus <i>exo70B2</i>	39
8.3.3	WT versus <i>exo70B1/exo70B2</i>	40
8.3.4	Nárůst konduktance	41
8.3.5	Pokles konduktance	43
8.4	Změna proporcí stomat: světlo vs tma	43
8.4.1	Velikost průduchů a apertury	43
8.4.2	Relativní změny celých průduchů a apertury	45
8.4.3	Proporce a tvar svěrací buňky	47
8.5	Lokalizace EXO70B1 a EXO70B2 ve stomatech	50
8.6	Lokalizace „core“ podjednotky exocystu SEC8	51
9	Diskuze	51
9.1	Otevřenost stomat	51
9.2	Stomatální vodivost	53
9.3	Hustota průduchů a vysoušecí experiment	55
9.4	Změny v proporcích průduchů <i>exo70B2</i>	55
9.5	Projev mutace <i>exo70B1</i> na <i>stomata</i>	56
9.6	Fenotypové projevy dvojité mutace <i>exo70B1/exo70B2</i>	56
9.7	Lokalizace podjednotek exocystu	57
10	Souhrn	58
11	Seznam citované literatury	59

Abstrakt

Výměna plynů mezi rostlinou a okolím je zprostředkována průduchovými buňkami, které změnou svého objemu regulují velikost průduchové štěrbin, kde k této výměně dochází. Jedinečné vlastnosti stomat jsou dány specificky utvářenou buněčnou stěnou, která dovoluje asymetrické roztažení buňky. V průběhu otevírání stomat dochází k velkému nárůstu turgorového tlaku, doprovázeného příjmem značného množství vody. Z tohoto důvodu je nutné rychle měnit vnitřní povrch průduchové buňky. Tento proces je zajištěn dynamickým pohybem membrán uvnitř buňky. Během těchto procesů jsou z plasmatické membrány odštěpovány váčky, které jsou při zavírání stomat integrovány zpět. Jeden z nejdůležitějších regulátorů polarizovaného transportu váčků v buňce je multiproteinový komplex exocyst. Díky multiplikaci podjednotek exocystu je u rostlin funkce komplexu exocyst značně diverzifikována a účastní se mnoha buněčných procesů. V této práci je studován vliv mutací genech *exo70B1*, *exo70B2* a jejich kombinace *exo70B1/exo70B2* na dynamiku stomat. Obě tyto mutace mají vliv na otevírání průduchů během zvýšené intenzity osvětlení. Mutace *exo70B1* je v tomto případě ovlivněna ve větší míře. Tyto defekty jsou však patně způsobeny jinými procesy, jelikož mutant *exo70B2* vykazuje menší velikost celých stomat i apertury v otevřeném stavu, ale tento projev však není přítomný u mutace *exo70B1*. Dvojitá mutace *exo70B1/exo70B2* částečně potlačuje tvorbu hypersenzitivních lézí způsobenou mutací *exo70B1* a pravděpodobně i částečně napravuje fenotyp *exo70B1* v otevírání stomat na světle.

Klíčová slova: Stomata, komplex exocyst, dynamika průduchů, konduktance stomat, *Arabidopsis thaliana*

Abstract

The exchange of gases between the plant and the environment is mediated by guard cells, which, by changing their volume, regulate the size of the stomatal pore where the exchange takes place. Unique properties of stomata are given by a specifically designed cell wall, allowing asymmetric cell expansion. During the opening of stomata, there is a large increase in turgor pressure, accompanied by the uptake of considerable amount of water. For this reason, it is necessary to quickly change the inner surface of the guard cell. This process is ensured by the dynamic movement of the membranes inside the cell. During these processes, the vesicles are removed from the plasma membrane and reintegrated back during stomatal closure. One of the important regulators of the polarized transport of vesicles within the cell is a multiprotein complex exocyst. Due to the multiplication of exocyst subunits, the exocyst complex functions in plants are extensively diversified and involved in many cellular processes. In this thesis the effect of mutation in subunits *exo70B1*, *exo70B2* and its combination *exo70B1/exo70B2*, on stomatal dynamics is studied. Both of these mutations affect the opening of the stomata during increased light intensity. The mutation of *exo70B1* is in this case affected in greater manner. These defects, however, may be caused by other processes, since the *exo70B2* mutant exhibits a smaller size of the entire stomata and aperture in the open state, unlike *exo70B1* mutant. The double mutation *exo70B1/exo70B2* partially suppresses the occurrence of hypersensitivity lesions caused by the *exo70B1* mutation and is likely to partially rescues the phenotype of the *exo70B1* in the light induced stomatal opening.

Key words: Stomata, complex exocyst, stomatal dynamics, stomatal conductance, *Arabidopsis thaliana*

1 Seznam zkratek

ABA	Kyselina abscisová
AD	Délka apertury průduchu
AŠ	Šířka apertury průduchu
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosin trifosfát
BO	Otevřená svěrací buňka
BZ	Zavřená svěrací buňka
BF	Bright field (světlé pole)
FAR	Fotosynteticky aktivní záření
HR	Hypersenzitivní reakce
PM	Plasmatická membrána
MT	Mikrotubuly
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Specifické molekulární sekvence patogenů)
PTI	PAMP triggered immunity (PAMP spouštěná imunita)
JA	Kyselina jasmonová
SA	Kyselina salicylová
SD	Délka celého průduchu
SŠ	Šířka celého průduchu
SOB	Stomatal opening buffer
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PO	Výška pólu svěrací buňky
SHAM	Salicylhydroxamová kyselina
GFP	Green fluorescent protein
WT	Wild type (divoký typ v této práci Col0)

2 Úvod a cíle práce

Rostliny si při přechodu na souš musely vyvinout mechanismus, který by jim zaručil dostatečné zásobení oxidem uhličitým a zároveň zabránil zbytečným ztrátám vody transpirací. Výsledkem evoluce jsou průduchy neboli stomata vyšších rostlin, jež jsou schopny aktivně regulovat velikost průduchové štěrbině a tím rychle přizpůsobovat intenzitu výměny plynů lokálním podmínkám. Ačkoliv buňky stomat postrádají plasmodesmální spoje, jsou schopny reagovat na obrovské množství podnětů jak z okolí, tak od ostatních buněk. Otevírání průduchů je velice komplexní proces zahrnující masivní změnu objemu a povrchu buňky. Pohyby stomat jsou totiž založeny na změnách vnitřního tlaku (turgoru), který je poháněn rozdílem vodního potenciálu uvnitř buňky a následnou akumulací vody. To samozřejmě vyžaduje nárůst vnitřního povrchu buňky, a tedy rychlou integraci membrán do plasmatické membrány, během zavírání naopak dochází k odštěpování vezikulů a tvorbě invaginací vnitřních membrán. Jelikož většinu z přijatého množství vody pojme vakuola, i zde je potřeba regulovat její objem. Změny vodního potenciálu jsou uskutečňovány prostřednictvím kanálů a pump, které zajišťují příjem či výdej iontů z buňky i vakuoly. To umožňuje velice složitou regulaci pohybů stomat a konkrétní odpověď na příslušný signál. Kanály se nacházejí na membránách uvnitř buňky a během změn objemu dochází k jejich opakované re-integraci prostřednictvím váčkového transportu. Komplex exocyst hraje stěžejní roli v polarizované sekreci vezikulů a proto se pravděpodobně účastní těchto procesů. Skládá se z osmi podjednotek, ze kterých nejrozšířenější rodina *EXO70* slouží k přesnému zacílení váčků na příslušné místo. Tato rodina osahuje 23 paralogních genů, jejichž úloha v buňce se odlišuje a tvoří tak komplikovanou sekreční síť zasahující do obrovské škály procesů v životě rostlinné buňky, včetně stomat.

Cíle práce

- Ověřit otevřenost stomat v ambientních a stresových podmínkách u jedinců nesoucích mutaci v podjednotkách *EXO70B1*, *EXO70B2* a u dvojitého mutantu *exoB1/exoB2*
- Zjistit, zda mají mutace vliv na tvar a počet stomat.
- Lokalizovat podjednotky ve stomatech pomocí fluorescenčních proteinů.

3 Současný stav poznání

4 Stomata

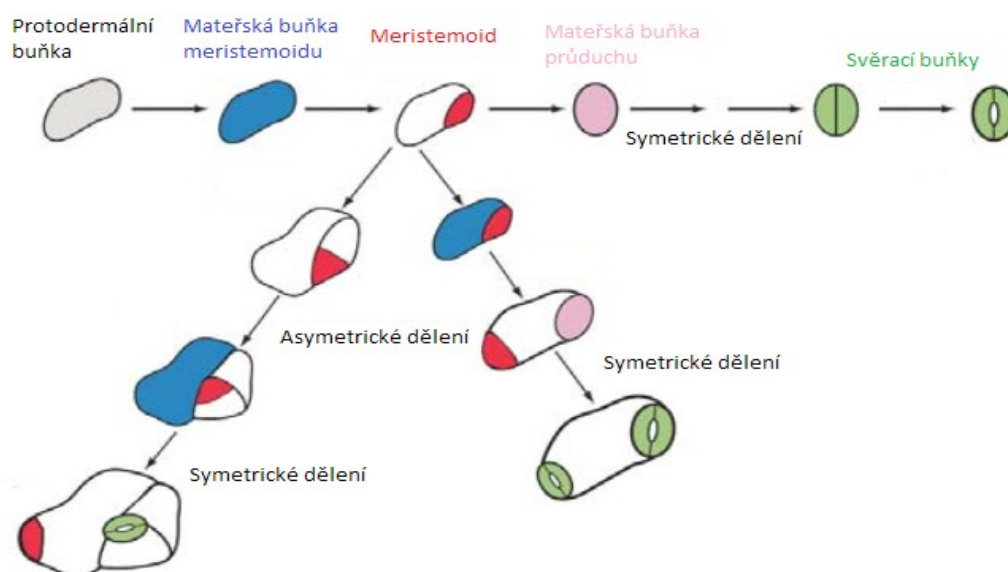
Průduchové štěrby jsou tvořeny párem vysoce specializovaných buněk, obecně známých jako svěrací buňky. Komplexy těchto svěracích buněk a vnitřní štěrby se nazývají průduchy či stomata a vyskytují se s různou hustotou v epidermis jak listu, stonku, tak dokonce i v květních částech rostliny. Jejich funkcí je regulace výměny plynů, příjem a výdej CO_2 a H_2O , mezi buňkami mezofylu a okolím.

V této práci je pro výzkum využívána modelová rostlina *Arabidopsis thaliana*, kde se výměna plynů odehrávají převážně na abaxiální straně listu, nicméně napříč rostlinnou říší existuje mnoho specializací na různé klimatické podmínky a průduchy mohou být rozličně modifikovány: vnořeny hluboko pod povrch epidermis či opatřeny složitou předprůduchovou štěrbinou. Tyto modifikace mají značný vliv jak na dynamiku, tak i na mechaniku stomat (P. J. Franks and Farquhar 2006). U *Arabidopsis* se žádná z těchto modifikací ve zvýšené míře nevyskytuje a je proto poměrně vhodnou modelovou rostlinou ke studiu dynamiky průduchů.

4.1 Vývoj stomat

Průduchy se zakládají z pokožkových buněk v mozaikovitém uspořádání, přičemž mezi každými dvěma průduchy se nachází minimálně jedna oddělovací buňka. Dva spolu přímo sousedící průduchy jsou výsledkem chybné cytokineze v průběhu jejich vývoje. Mateřskou buňkou dávající vznik buňkám průduchů je meristemoid, který vzniká asymetrickým dělení původní buňky. Následujících vývojových cest je několik, všechny však zahrnují kombinace symetrických a asymetrických dělení (Paliwal 1967) (Obrázek 1). Hustota průduchů se liší druh od druhu, nicméně jak bylo zjištěno (Lake et al. 2001; Xu and Zhou 2008), rostlina je schopna hustotu průduchů regulovat v závislosti na rozličných faktorech okolního prostředí a odvíjí se tedy i od podmínek kultivace. Na vývoji průduchů se podílí rovněž bezpočet genů, jako hlavní představitelé lze uvést gen *YODA*, jehož mutace má za následek přetvoření většiny pokožkových buněk ve stomata, či gen *SDD1*, jenž má přímý vliv na vzor zakládání průduchů (Bergmann et al., 2004). Regulace hustoty se rovněž účastní řada fytohormonů především kyselina abscisová (ABA) (Pantin et al. 2013; Chater

et al. 2014; Caine et al. 2016) dále pak auxin (Le et al. 2014), giberiliny (Saibo et al. 2003) i brassinosteroidy (Kim et al. 2012)



Obrázek 1 Model vývoje průduchů u *Arabidopsis thaliana*. (převzato a upraveno z Bergmann and Sack 2007)

4.2 Turgor

Jako turgor se označuje tlak plasmatické membrány na buněčnou stěnu buňky. Tento tlak je generován příjmem a zadržováním vody uvnitř buněk. Pohyb vody se odvíjí od rozdílu vodního potenciálu mezi buňkami a okolním prostředím. Složek, jež se podílejí na výsledné hodnotě vodního potenciálu je několik (Glinka 1971; Taiz and Zeiger 2010). Pro představu je však možné je zjednodušit na tři hlavních představitele:

- Osmotický potenciál, jež je dán množstvím (koncentrací) rozpuštěných látek v roztoku.
- Tlakový potenciál je u rostlin způsoben odporem, jenž klade nedokonale elastická plasmatická membrána, a hlavně rigidní buněčná stěna, během zvyšování objemu.
- Gravitační potenciál, který je dán vzdáleností od zemského povrchu, hustotou a gravitačním zrychlením. Na změně vodního potenciálu se ze všech tří složek podílí nejméně.

Tyto tři složky tedy dohromady tvoří konečnou podobu vodního potenciálu, který v buňkách obvykle nabývá záporných hodnot (čistá voda = 0), přičemž voda má tendenci téci z míst s vyšší hodnotou vodního potenciálu do míst s hodnotou nižší. Intenzita s jakou turgorový tlak působí na stěny průduchových buněk je značná a pohybuje se v rozmezí cca 1-5 MPa (P. J. Franks, Cowan, and Farquhar 1998; Peter J Franks et al. 2001).

Pro rostliny je turgor klíčovým faktorem zajišťujícím otevírání a zavírání stomat, rovněž hraje nepostradatelnou roli v objemovém růstu buněk a je nedílnou součástí některých pohybů a celkové opory rostlinného těla (Taiz and Zeiger 2010).

5 Regulace a dynamika stomat

Jak už bylo řečeno, na rozdíl od většiny ostatních pokožkových buněk, jsou průduchy schopné aktivně měnit svůj tvar v závislosti na okolí a vnitřní signalizaci. Tyto pohyby jsou dány změnou turgoru uvnitř svěřacích buněk, které se při zvýšení turgoru rozpínají a tím indukují otevření průduchu, naopak pokles turgoru má za následek uzavření průduchové štěrbin. Tento efekt je mimo jiné i umožněn izolací stomat od svého okolí. Dospělé průduchy totiž nemají žádné plasmodesmy (Wille and Lucas 1984). Hnacími silami generující změny turgoru jsou příjem a výdej kationtů a aniontů, a to jak mezi plasmatickou membránou a apoplastem, tak mezi cytosolem a vakuolou.

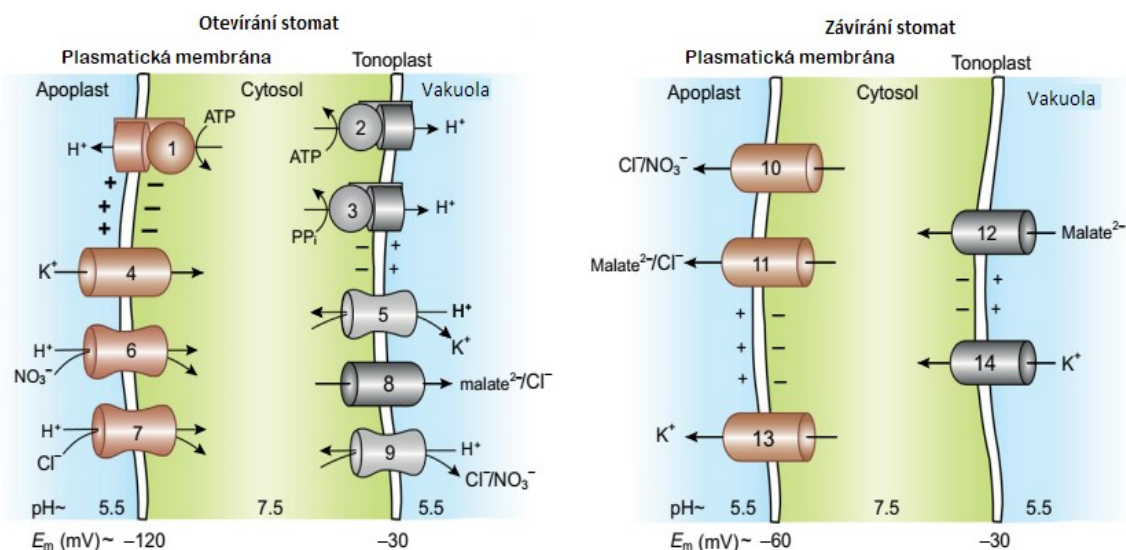
Hlavními osmoticky aktivními ionty, jež vytvářejí změny vodního potenciálu, je u rostlin především draselný kationt K^+ (Fischer 1968), chloridový aniont Cl^- (Vahisalu et al. 2008) a syntéza organických kyselin především malátu (Kovermann et al. 2007). Jelikož je plasmatická membrána sama o sobě nepropustná pro molekuly s nábojem, využívá rostlinná buňka specializovaných kanálů a přenašečů, jež umožňují rychlý transport skrze jak plasmatickou membránu, tak přes membránu vakuoly (tonoplast). Svěřací buňky disponují řadou těchto specifických proteinů. Mezi ty nejdůležitější patří kanály z genové rodiny *Shaker* tj. KAT1, KAT2, AKT1 a AKT2/3 zajišťující příjem draselných kationtů do buňky (Nakamura et al. 1995; Szyroki et al. 2001; Pilot et al. 2001, 2003; Lebaudy et al. 2008). V opačném směru jsou to pak pro draselné ionty kanály GORK (Hosy et al. 2003) spolu s proteiny KUP6 a KUP8 (Osakabe et al. 2013). Všechny tyto kanály náleží do skupiny napětím ovládaných přenašečů a nachází se na plasmatické membráně. Transport aniontů probíhá mimo jiné skrze proteiny z rodiny SLAC1 pro Cl^- a SLAH3 pro NO_3^- , jež reagují na svou aktivaci buď velmi rychle, R-typ, či pomalu, S-typ (Vahisalu et al. 2008; Geiger et al. 2011). Většina přijatých iontů je následně ukládána do vakuoly, jejíž membrána rovněž

disponuje množstvím přenašečů. Na rozdíl od plasmatické membrány, je však transport iontů do vakuoly zprostředkován proteiny z rodiny NHX a přímo spojen s výměnou vodíkových protonů H^+ za kationt K^+ či Na^+ (Barragan et al. 2012). Dále jsou to pak specializované dvou-pórové kanály TPK, které jsou téměř rezistentní ke změnám membránového potenciálu a jejich aktivita je spouštěna Ca^{2+} ionty, navázáním proteinu 14-3-3 a změnou mechanického pnutí tonoplastu (Peiter et al. 2005; Gobert et al. 2007; Latz et al. 2007; Maathuis 2011;). Transport vody do cytosolu, vakuoly a případně dalších organel je zajištěn příslušnými akvaporiny (Rongfeng et al. 2002; Fraysse et al. 2005; Grondin et al. 2015;).

5.1 Otevírání a zavírání stomat

Otevírání či zavírání stomat je spouštěno změnou napětí na plasmatické membráně. U rostlin tyto změny běžně zajišťují H^+ ATPázové pumpy AHA1 (Ueno et al. 2005; Yamauchi et al. 2016; Inoue and Kinoshita 2017), jenž za spotřeby ATP transportují protony vodíku z buňky. Během otevírání stomat se zvyšuje záporný náboj cytosolu aktivitou AHA1 pump až na -180 mV (Jezek and Blatt 2017 review), současně dochází k inhibici aniontových přenašečů SLAC1 (Vahisalu et al. 2008) a SLAH3 (Geiger et al. 2011). Tím dojde k takzvané hyperpolarizaci membrány, což má za následek otevření výše zmíněných kanálů KAT1, KAT2, AKT1 a vtok K^+ iontů z apoplastu do cytosolu (Nakamura et al. 1995). K efektivní změně napětí rovněž přispívá dvojice specializovaných protonových pump H^+ ATPáza typu V a H^+ pyrofosfatáza, jenž na místo ATP spotřebovává pyrofosfát. Obě tyto pumpy jsou situované na tonoplastu a vytvářejí proton-motivní gradient pro translokaci iontů do a z vakuoly. Výsledkem těchto dějů je poté masivní snížení vodního potenciálu v buňkách průduchů, akumulace vody ve vakuole a otevření průduchu (Jezek and Blatt 2017).

Zavření průduchové štěrbin je naopak provázeno depolarizací membrány a inhibicí draselných kanálů KAT1 a ATPázových pump. Aktivace aniontových kanálů následně způsobuje rychlou depolarizaci a poklesem napětí se dochází k otevření kanálů GORK (Hosy et al. 2003), které umožní výtok draselných kationtů z buňky ven, snížení vodního potenciálu apoplastu, následný pokles turgoru v průduchových buňkách a uzavření průduchové štěrbin (Obrázek 2) (shrnutí v Kollist, Nuhkat, and Roelfsema 2014; Jezek and Blatt 2017).



Obrázek 2 Schéma transportu iontů skrze plasmatickou membránu a tonoplast. Během otevírání dochází vlivem činnosti ATPázových pump na membráně (1), tonoplastu (2) a pyrofosfátové pumpy (3) k hyperpolarizaci plasmatické membrány a aktivaci iontových kanálů pro draslík (4), NO₃⁻ (6), Cl⁻ (7). Většina těchto iontů je následně přemístěna do vakuoly prostřednictvím přenašečů NHX (5) a kanálů (8) a (9). Zavření průduchů je indukováno depolarizací membrány skrze inhibici ATPázových pump a aktivaci aniontových kanálů (10 a 11). To následně způsobuje aktivaci kanálů pro výtok kraselných iontů z buňky (13), potažmo vakuoly (14) a pravděpodobně i výtoku malátu (12). (převzato a upraveno z Kollist, Nuhkat, and Roelfsema 2014)

5.2 Regulace stomat

Aby mohla rostlina maximálně využít potenciál svého metabolismu, musí velice přesně regulovat otevírání a zavírání průduchů. Do jisté míry je průduch sám o sobě schopen přizpůsobit velikost štěrbinu v závislosti na aktuálních, okolních podmínkách, proto je často možné pozorovat různě otevřené průduchy i na jednom listu. V případě, že se rostlina dostane do stresové situace, či přechází z denní fáze do noční, je schopna ovládat aktivitu průduchů hromadně (Jezek et al., 2017 review).

5.2.1 Světlo a CO₂

Nejdůležitějšími faktory pro rostlinu, co se týče otevírání průduchů, jsou světlo a dostupnost CO₂ pro fotosyntetický aparát. V případě světla se otevírání stomat odvíjí od intenzity modrého a červeného světla dopadajícím na rostlinu. Rostlinné buňky disponují specializovanými receptor-kinázovými proteiny PHOT1 a PHOT2, které při aktivaci

modrým světlem spouštějí skrze protein-kinázou BLUS1 otevírání stomat, konkrétně dochází k aktivaci protonových pump AHA1 (Kinoshita et al. 2001; Yamauchi et al. 2016). Poměrně dlouho byl účinek červeného světla spojován pouze s aktivací fotosyntetického aparátu (W. Wu and Assmann 1993). V nedávné době bylo však prokázáno zapojení fytochromů A i B (PHYA, PHYB) do regulace stomat. Jejich funkce se zdá být částečně redundantní a vypnutí obou těchto genů má za následek pouze menší velikost apertury stomat, klíčovým se ovšem jeví PHYB. Přesná dráha není doposud zcela objasněna, nicméně u rostlin je percepce červeného světla, respektive kombinace modrého a červeného světla, nutná pro rychlé a úplné otevření stomat a rovněž má značný vliv na regulaci protonových pump (F.-F. Wang et al. 2010; Suetsugu et al. 2014; Assmann et al. 2014).

Dostupnost oxidu uhličitého je patrně monitorována fotosyntetickým aparátem v buňkách mezofylu, zatím však nebyl objeven mechanismus, jakým přesně probíhá jeho recepce. Je však jisté spjat s přítomností světla a množstvím produktů vzniklých během fotosyntézy. Nicméně při jeho zvýšené koncentraci či nedostatku obecně dochází ke změně dynamiky stomat. V případě, že množství CO_2 respektive HCO_3^- je v buňkách mezofylu nízké, dochází k hromadnému otevření stomat. Naopak vysoké množství CO_2 indukuje jejich přivření, jelikož je fotosyntetický aparát dostatečně zásoben a není proto potřeba ztrácet vodu transpirací (Mott, Sibbersen, and Shope 2008). Pravděpodobným kandidátem na regulaci dynamiky stomat v závislosti na množství CO_2 je β -carbonic anhydráza βCA1 a βCA4 , jejíž dvojitý mutant vykazuje poruchu v odpovědi na zvýšené množství CO_2 v okolí (Hu et al. 2009).

5.2.2 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je rostlinný fytohormon, jenž se účastní mnoha buněčných pochodů během života rostliny. Obecně má ABA značně negativně regulační efekt, udržuje v dormanci semena a negativně ovlivňuje navození klíčení, podílí se na regulaci buněčného cyklu, je odpovědná za tvorbu zásobních proteinů a rovněž se účastní mnoha stresových reakcí. Jejím hlavním polem působnosti je však obrana před vodním stresem. Nedostatek vody jak v kořeni, tak i v listech, spouští syntézu ABA, která je následně rozváděna po těle rostliny prostřednictvím xylému (Gowing, Jones, and Davies 1993).

Rozpoznání ABA ve stomatech vede k inhibici protonových pump, k aktivaci aniontových kanálů S-typu SLAC1 (Vahisalu et al. 2008) a následně rychlému uzavření pórů stomat (jak bylo popsáno výše). Ačkoliv je tento účinek již dlouho znám a zkoumán, teprve

nedávno byla pouze částečně objasněna signalizační kaskáda doprovázející receptci kyseliny abscisové a doposud jsou stále objevovány nové a nové interaktory tohoto fytohormonu. V roce 2010 Nishimura et al. zjistili, že transdukci signálu k uzavření průduchové štěrbin v přítomnosti ABA patrně zprostředkovávají solubilní proteiny z rodiny PYR/PYL/RCAR (Ma et al. 2009; Park et al. 2009), jejichž čtyřnásobný mutant *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* není schopen zavírat průduchy v přítomnosti ABA (Nishimura et al. 2010). Aktivace těchto receptorů inhibuje protein fosfatázy ABI1, ABI2 a HAB1 (Gosti et al. 1999; Merlot et al. 2001; Saez et al. 2004), to následně umožňuje kináze OST1 interagovat s NADPH oxidázou a spouští tvorbu oxidových radikálů (ROS) a oxidu dusného NO, který má velmi podobný efekt jako ROS (Mustilli et al. 2002; Murata et al. 2001; Sierla et al. 2016). Podstatnou roli v přenosu signálu pak hraje vylití vápenatých iontů Ca^{2+} z vakuoly, endoplasmatického retikula i apoplastu, vedoucím k aktivování aniontových kanálů SLAC1 (Reliable et al. 2000; Blatt et al. 2000; Vahisalu et al. 2008; Brandt et al. 2015; Minguet-Parramona et al. 2016).

Tento Ca^{2+} signál může být rostlinou interpretován rozličným způsobem a velice záleží na jeho oscilacích a momentálním stavu buňky (review Blatt 2000; Minguet-Parramona et al. 2016). Kupříkladu právě kanály SLAC1 jsou mnohokrát citlivější k minimálním změnám koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu v přítomnosti ABA než v běžném stavu (Brandt et al. 2015) obr. Což umožňuje rostlině zavřít všechny průduchy bez rozdílu na aktuálním stavu jednotlivých stomat. V neposlední řadě je ABA zapojena i do regulace samotných akvaporinů PIP2;1 rapidním zvýšením permeability pro vodu (Grondin et al. 2015).

5.2.3 Kyselina salicylová a jasmonová

Kyselina salicylová (SA) i jasmonová (JA) jsou stresovými hormony, jež se účastní v obraně proti patogenům. Jejich účinkem dochází k zavírání průduchů a tím k snížení pravděpodobnosti průniku patogenního organismu do těla rostliny. Signál pro uzavření stomat prostřednictvím SA je spojen s tvorbou ROS (převážně superoxidu) SHAM-sensitive peroxidázou, vylitím Ca^{2+} iontů a inhibicí draselných kanálů pro vtok do buňky (Mori et al. 2001; Khokon et al. 2011). Tím se účinek SA odlišuje od efektu JA a ABA. Kyselina jasmonová indukuje tvorbu ABA, čímž se napojuje na ABA závislou signální dráhu a je tedy v částečném překryvu s jejím účinkem (Munemasa et al. 2007; Hossain et al. 2011). Mnoho jak bakteriálních, tak houbových patogenů disponuje látkami schopnými navodit otevření

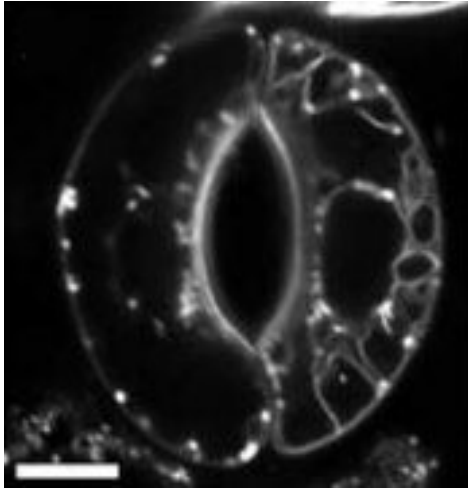
stomat. Tyto metabolity jsou dnes používány jako drogy usnadňující práci se stomaty, jedná se například o fusicoccin či coronatin (Eun and Lee 2000; Zheng et al. 2012).

Látek podílejících se na regulaci stomat je nespočet, patří mezi ně další fytohormony, auxiny, cytokininy apod. Ovšem jejich vliv je ve srovnání s výše uvedenými zanedbatelný a obecně nejsou považovány za klíčové (Davies 2010).

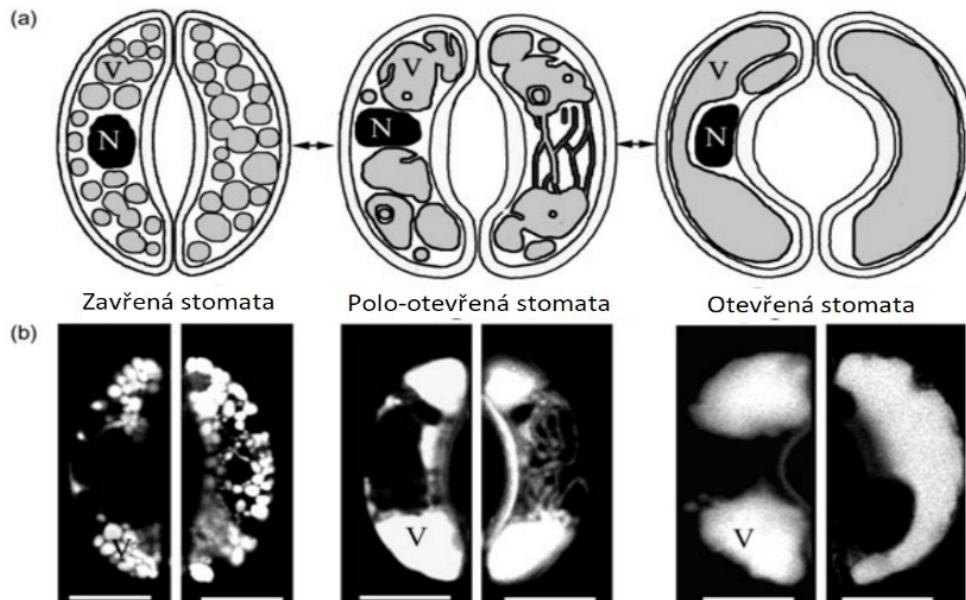
5.3 Dynamika membrán

Během otevírání či zavírání stomat dochází k masivní změně povrchu a objemu celé buňky, plasmatické membrány a tonoplastu. Rozdíl v povrchu plně otevřených stomat oproti zavřeným může být až 40 % (Peter J Franks et al. 2001; Shope, DeWald, and Mott 2003). Elasticita plasmatické membrány i tonoplastu se pohybuje okolo 2 % (Wolfe and Steponkus 1983). To znamená, že během zvyšování či snižování turgoru musí v buňkách stomat docházet k rychlé a opakované integraci membránových váčků a k vnitřnímu vrásnění membrán (Shope, DeWald, and Mott 2003; Tobias Meckel et al. 2004). Díky moderním metodám genového inženýrství a možnostem konfokálních mikroskopů, je možné poměrně dobře sledovat dynamiku buněčných membrán. Meckel et al. zjistili, že části plasmatické membrány, které jsou endocytovány během zavírání průduchů, nejsou náhodné a liší se od sebe svou velikostí a složením proteinů (Hurst et al. 2004; Tobias Meckel et al. 2004). Některé z malých vezikulů nesou na svém povrchu draselné kanály KAT1 a jejich zpětná integrace přímo působí na dynamiku stomat (Hurst et al. 2004). Větší tělesa mají pak zřejmě charakter pre-vakuolárních endosomů, největší tubuly a vezikuly jsou vzniklé osmocytozou, což je pouze fyzikální nemetabolický jev (Tobias Meckel et al. 2004).

Nemalých fluktuací na objemu i povrchu doznává vakuola, jež v plně otevřeném průduchu může zabírat až více 90 % celkového objemu buňky. Zavřeném stavu je vakuola poklesem objemu rozčleněna do tubulárních výběžků, případně může docházet i k fragmentaci na malé samostatné vakuoly (Diekmann et al. 1993; Tanaka et al. 2007; X. Q. Gao et al. 2009). Tyto změny navíc doprovází tvorba intravakuolárních tělísek, obsahujících vysoké množství transmembránových proteinů (X. Q. Gao et al. 2009). Rychlá změna objemu a povrchu tonoplastu je částečně regulována hodnotou pH uvnitř vakuoly a přítomností fosfatidylinositol 3,5-bisfosfátu, potažmo aktivitou fosfatidylinositol 3-fosfát 5 kinázy (PI3P5K). Mutant s touto nefunkční kinázou, vykazuje mnohem pomalejší zavírání stomat než nemutantní jedinec (Bak et al. 2013).



Obrázek 3 Znárodnění invaginací plasmatické membrány v stomatech
Plasmatická membrána je vizualizována pomocí FM1-43. Úsečka =10 μ m převzato a upraveno z (Tobias Meckel et al. 2004)



Obrázek 4 Srovnání modelu (a) a mikroskopického snímku (b) dynamiky vakuoly ve třech stádiích otevřenosti stomat u *Vicia faba*. (N) jádro, (V) vakuola. Úsečka = 10 μ m. (Převzato a upraveno z Gao et al., 2009)

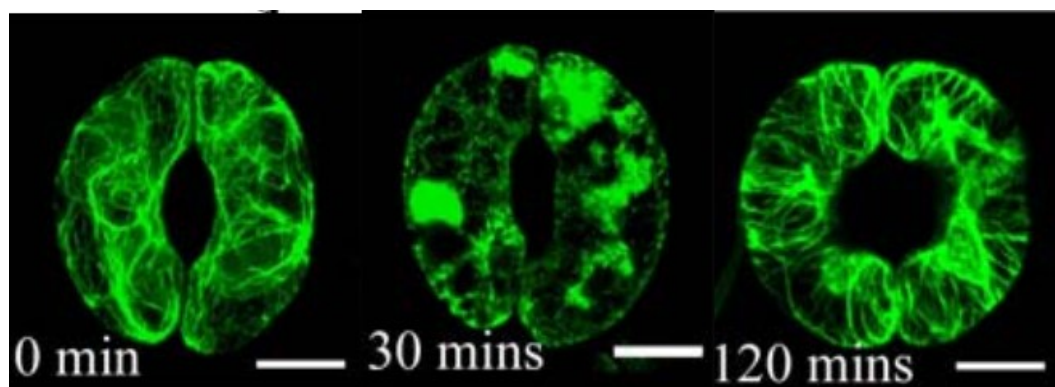
5.3.1 Vliv cytoskeletu na dynamiku stomat

5.3.1.1 Aktin

Nezanedbatelnou roli hraje v dynamice stomat reorganizace cytoskeletu. Směr a množství aktinových vláken se v průběhu otevírání či zavírání stomat značně liší. Nicméně jak v zavřeném, tak v otevřeném průduchu je možné sledovat jak náhodné, tak prstencovité uspořádání filament, což svědčí o značné dynamice tohoto procesu. Ve výsledku však dochází během otevírání stomat k reorganizaci aktinových vláken z náhodně uspořádaných

k prstencovitým (Obrázek 5) (Jing et al. 2008; X. Q. Gao et al. 2009; K. Jiang et al. 2012). Polymerace, depolymerace a reorganizace aktinu je tedy spojená s přechodem mezi těmito dvěma stavy o čemž svědčí nepřítomnost těchto struktur ve fázi otevírání a zavírání. Použití cytoskeletálních de/stabilizačních drog má tedy značný vliv pohybu stomat (X. Q. Gao et al. 2009; Jing et al. 2008). Dynamiku aktinu zajišťuje mimo jiné ARP2/3 komplex, protein odpovědný za větvení a nukleaci aktinových filament. Aktivita tohoto komplexu je regulována kyselinou abscisovou (ABA) a jak bylo zjištěno, ARP2/3 se přímo podílí na iniciaci zavírání či otevírání průduchů a (K. Jiang et al. 2012). Pomocí inhibitoru polymerizace aktinu CD a phalloidinu s opačným efektem, Zhang et al. 2007 objevili spojení aktinu a cytoplasmatického Ca^{2+} kanálu, který je aktivován mechanickým pnutím. Tento mechanismus pravděpodobně slouží jako ukazatel plně otevřeného průduchu, překročí-li turgorový tlak určitý práh, dojde k aktivaci toho kanálu a příjmu Ca^{2+} iontů a k inhibici draselných kanálů KAT (W. Zhang, Fan, and Wu 2007).

Velmi důležitou součástí rostlinné buňky, jež je patrně ovlivněna aktinovým cytoskeletem, je i vakuola. Jak už bylo popsáno výše, tonoplast doznává v důsledku pohybu stomat značných změn. Tvorba vezikulů a tubulů je velmi důležitým faktorem ovlivňujícím dynamiku stomat (X.-Q. Gao et al. 2005; X. Q. Gao et al. 2009), tato funkce je však také narušena mutací v ARP2/3 komplexu. Fenotypovým projevem je pak průduch, neschopný reagovat na signál pro otevření či zavření (X. Q. Gao et al. 2009; K. Jiang et al. 2012).



Obrázek 5. Změna uspořádání aktinových filament v průběhu na světle otevíraných průduchů. Náhodně organizovaná vlákna depolymerují a uspořádávají se do prstencovité struktury v otevřeném stavu (120 min). Úsečka=10 μ m. (Převzato a upraveno z Jing et al., 2008).

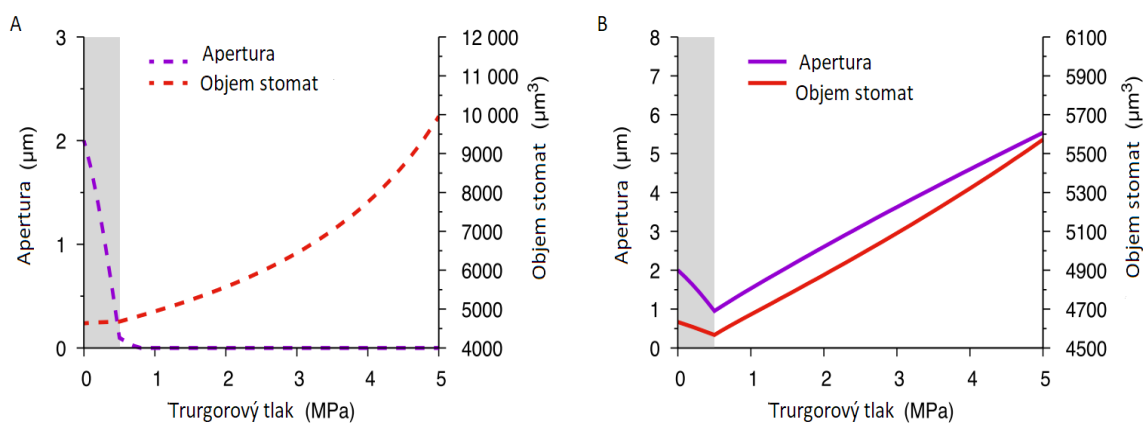
5.3.1.2 Mikrotubuly

Mikrotubulární síť (MT) je rovněž nezbytnou součástí funkce stomat. Stěžejní funkcí MT cytoskeletu je ukládání buněčné stěny během vývoje průduchu, uplatňuje se však i v pozdější fázi. Obdobně jako filamenta aktinu i mikrotubuly procházejí dynamickými změnami. Propojení mikrotubulů s pohyby stomat bylo poprvé pozorováno v roce 1998, jako odlišná organizace MT během střídání noci a dne (Fukuda et al. 1998). Za dne plně otevřené průduchy obsahují množství vysoce organisovaných MT, zatímco v noci jsou stomata uzavřená a MT depolymerizovány (Fukuda et al. 1998). Zdánlivě by bylo možné přisoudit tento fenomén pouze změnám doprovázejícím pohyby průduchů, jako je tomu u aktinu. Ovšem v tomto případě je reorganizace MT velice rychlá (v rádech minut) a patrně částečně regulována světelným zářením (Lahav et al. 2004). Nicméně inhibicí polymerace MT pomocí drog jako je oryzalin, dochází k úplnému zastavení otevírání průduchů (Marcus, Moore, and Cyr 2001; Eisinger, Ehrhardt, and Briggs 2012). Přesná úloha MT cytoskeletu není doposud kompletně objasněna, pravděpodobně stojí re-modelace MT na počátku signalizační kaskády pro zavření nebo otevření stomat, čemuž nasvědčuje i nedávno objevená interakce MT s ABA, která indukuje jejich depolymeraci (Y. Jiang et al. 2014).

5.3.2 Buněčná stěna

Pro efektivní fungování průduchů je stěžejní správné ukládání buněčné stěny kolem průduchové šterbiny a neméně její celkové složení. Takto specificky ztloustlé buněčné stěny svěracích buněk, rozkládají turgorový tlak na stěny nerovnoměrně, tímto je možné docílit konkrétních pohybů svěracích buněk (Tobias Meckel et al. 2007). Díky moderním technologiím a výkonným počítačům je dnes možné matematicky modelovat chování stomat s různě rostlou buněčnou stěnou či odlišným složením matrix. Poměrem homogalaktouronanů a rhamnogalaktouronanů, respektive jejich postranních řetězců (arabinany, galaktany) (Jones et al. 2003; Amsbury et al. 2016). Velikost apertury úzce souvisí s objemem průduchové buňky a již zmiňovaném uložení buněčné stěny, respektive celulózových mikrofibril po obvodu (Carter et al. 2017; Woolfenden et al. 2017; Marom, Shtein, and Bar-On 2017). Průduch, jenž by měl rovnoměrně (isotropně) rostlou buněčnou stěnu, by se vyznačoval velice odlišnou dynamikou a při turgorovém tlaku, běžným pro plně otevřená stoma 5MPa, by byl naopak zcela uzavřen (Obrázek 6) (Woolfenden et al. 2017). I malé změny ve formaci BS průduchů, vedou k pozměnění funkce stomat. Projevem mutace v podjednotce celulóza-syntázy *CesA7^{irx3-5}* je průduch, který vykazuje stejnou odezvu na

signály jako WT, nicméně apertura mutantního průduchu je menší a ztráta vody transpirací je tak snížena (Liang et al. 2010). Je rovněž třeba vzít v úvahu i úlohu buněk sousedících s průduchy, jejichž turgorový tlak klade odpor otvírajícím se stomatům (Woolfenden et al. 2017; Carter et al. 2017). Veškeré tyto faktory mají pak ve výsledku zásadní vliv na celkovou mechaniku stomat. Například na pólech odlišné složení matrix BS uvnitř průduchové buňky téměř fixuje délku celého průduchu a mění se tak pouze velikost póru, což maximalizuje efektivitu otevírání a zavírání (Carter et al. 2017). BS i přes svou značnou rigiditu obsahuje složky umožňující její částečné rozvolňování. Stěžejní roli v tomto směru mají hlavně pektiny, arabinany a de-methyl esterázy, které mají vliv na elasticitu BS a tím i dynamiku stomat (Jones et al. 2003; Amsbury et al. 2016). Výsledky těchto studií ukazují, že pohyby, které průduchy vykonávají během otevírání a zavírání, jsou velice komplexní a zahrnují množství torzních a horizontálních změn, nikoliv pouhou plošnou separaci průduchových buněk od sebe. Odlišnost tvaru, proporcí apertury a celého průduchu v závislosti na velikosti turgorového tlaku, značně znesnadňuje měření a interpretaci otevřenosti průduchů ve stavu jiném než v plně zavřeném a otevřeném. Poměrně zavedená technika strhnutí epidermální vrstvy buněk, může mít za následek ztrátu vlivu sousedních buněk průduchů, případně různé dimenzionální a proporční změny způsobené oddělením od mezofylu. Je proto třeba věnovat nemalé množství pozornosti při volbě metodiky.

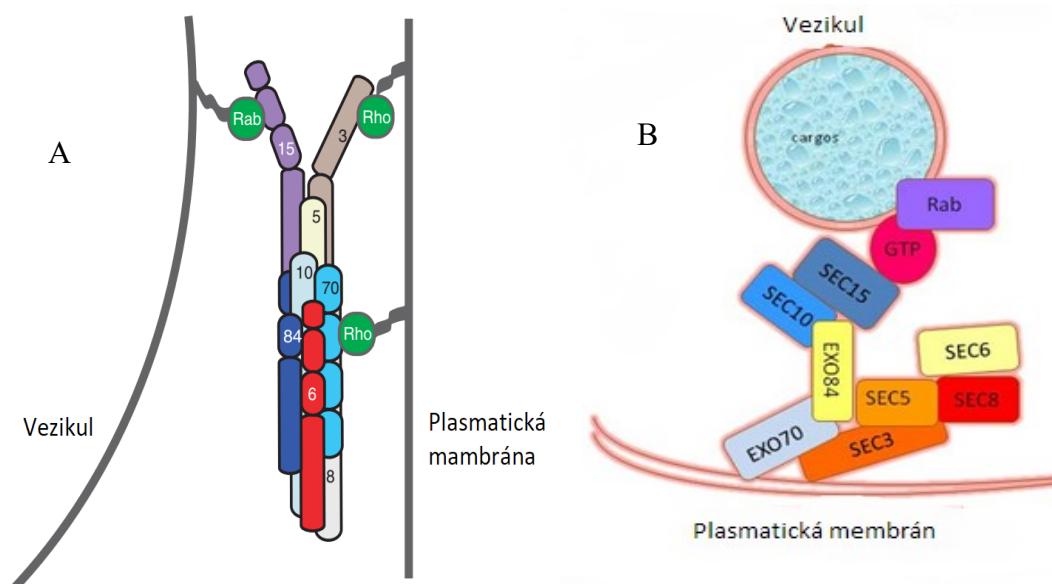


Obrázek 6 Modelové znázornění chování průduchové apertury a objemu stomat na změnu turgorového tlaku bez specifického uložení celulózových mikrofibril (A) a s cirkumferenciálně uloženými mikrofibrilami (B). Šedivý úsek odpovídá protitlaku, jež způsobují epidermální buňky. (Převzato a upraveno z Woolfenden et al., 2017).

6 Exocyst komplex

Buněčná stěna a organizace rostlinného těla neumožňuje buňkám migrovat, proto je pro rostliny velice důležitá vnitrobuněčná komunikace, zprostředkovaná váčkovým transportem. Jedním z mnoha mechanismů zapojených do tohoto procesu je exocyst, multiproteinový komplex skládající se z 8 podjednotek (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84) a zajišťující přesné zacílení váčkového transportu na plasmatickou membránu (Guo, Grant, and Novick 1999; Guo et al. 1999; Boyd et al. 2004; Munson and Novick 2006), tak aby mohlo v dalším kroku dojít ke splnutí vezikulu a PM pomocí proteinů ze skupiny SNARE (Sutton et al. 1998; Söllner et al. 1993). Na základě pozorování různé distribuce jednotlivých podjednotek v kvasinkách, byl sestaven model exocystu (viz *Obrázek 7 A*) (Boyd et al. 2004; Munson and Novick 2006). Podle tohoto modelu je vazba na vezikul nepřímá a je zprostředkována Rab GTPázou, která spojuje váček s proteinem Sec15p (A. X. Zhang et al. 2004), na nějž se váží Sec10p a Sec84p (Guo et al. 1999). Jádro komplexu tvoří Sec5p, Sec8p (Sivaram et al. 2006; Guo et al. 1999) a podjednotka Sec6p interagující s proteiny SNARE (Shen et al. 2013; Dubuke et al. 2015). S PM asociují skrze fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát dvě zbývající podjednotky Sec3p a Exo70p (He et al., 2007; Zhang et al., 2008), jež jsou regulovány GTPázami Rho (Guo, Tamanoi, and Novick 2001; Robinson et al. 1999). K fúzi vezikulu a PM může dojít v případě úspěšného sestavení celého komplexu (Grote, Carr, and Novick 2000; Cvrčková et al. 2012). Evolučně je exocyst konzervován, lze ho nalézt jak u kvasinek, na kterých byl objeven (TerBush et al. 1996), tak u pokročilých živočichů (savčí model) (S. Hsu et al. 1998; S. C. Hsu et al. 1996; Andrews et al. 2002; Murthy et al. 2003) a rovněž u rostlin, kde ovšem došlo k značnému zmnožení genů v některých podjednotkách (Elias et al. 2003; Hala et al. 2008; Cvrčková et al. 2012). Modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* obsahuje ve svém genomu 23 kopií genů pro podjednotky *EXO70*, tři kopie *EXO84* a dvě *SEC3,5,10,15* (Cvrčková et al. 2012).

Rostlinný model pro sestavování komplexu exocyst se od kvasinkového částečně odlišuje (*Obrázek 7 B*). U *Arabidopsis* *EXO84b* interaguje oběma konci s *SEC15b* a *EXO70A1* (Fendrych et al. 2010). Na dvou-hybridovém kvasinkovém testu byla u rostlin dokázána interakce mezi *SEC3a* a *EXO70A1*, jež nebyla pozorována u kvasinek a savců (Hala et al. 2008).



Obrázek 7 Srovnání modelu komplexu exocyst pro kvasinky (A) a rostliny (B). (A) převzato a upraveno z (Munson and Novick 2006). Druhý model byl zhotoven T. Pečenkovou CSC.

Jak už bylo řečeno, komplex exocyst se účastní polarizovaného transportu. Konkrétní destinaci určují podjednotky EXO70 a SEC3 (Pleskot et al. 2015; Bloch et al. 2016). Multiplikace genů, převážně v podjednotce *EXO70*, má zásadní vliv na nárůst komplexity procesů, jejichž se exocyst v rostlinách účastní. Důležitost jednotlivých paralogů v rodině *EXO70*, rovněž dokazují výsledky publikovaných studií. Podjednotka EXO70A1 má společně se SEC8, SEC6, SEC15b a EXO84b zásadní vliv na formaci buněčné přepážky a cytokinezi buněk (Fendrych et al. 2010). Proces tvorby buněčné přepážky je doprovázený intenzivní exocytózou a fúzí vezikulů, jenž je u těchto mutací narušena. EXO70A1 se rovněž účastní tvorby pektinového obalu vulkanických buněk (Kulich et al. 2010) Významnou roli hraje i podjednotka EXO70H4 podílející se na depozici kalózy v trichomech (Kulich et al. 2015). Komplex exocyst je tedy zásadním faktorem umožňujícím a regulujícím váčkový transport, účastní se tudíž mnoha pochodů spojených s polarizací buňky, recyklací proteinů i samotné PM a rovněž i v obraně před patogeny (Hala et al. 2008; Pečenková et al. 2011; Drdová et al. 2013; Sekereš et al. 2017)

6.1 Role podjednotky EXO70B1 v buňkách pokožky a stomat

6.1.1 Autofagie a obrana před patogeny

Funkce podjednotky EXO70B1 je v dnešní době spojována s autofagickou drahou, účastní se však i různých obraných reakcí. Autofagie je specializovaný typ váčkového transportu zacíleného do vakuoly. Aktivita tohoto procesu masivně vzrůstá za stresových podmínek ať už se jedná o nutriční hladovění či napadení patogenem. Účastní se však i víceméně běžných buněčných pochodů jako je degradace poškozených organel, proteinů i jiných látek v buňce. Osudem nákladu, jenž je dopravován do vakuoly pomocí autofagie, nemusí být nutně destrukce, některé metabolity jsou takto transportovány za účelem skladování. Tak je tomu například u anthokyanů, kde autofagická dráha představuje jeden ze dvou možných postupů dopravy (Poustka et al. 2007). Specializací této autofagické dráhy je nezávislost na golgiho aparátu, který jednoduše obchází a tvoří tak přímé spojení mezi endoplasmatickým retikulem a vakuolou (Poustka et al. 2007; Kulich et al. 2013). Formace autofagosomu zahrnuje mimo EXO70B1 rovněž i podjednotky EXO84b a SEC5 (Kulich et al. 2013). Fenotyp mutantu *exo70B1* se projevuje právě výše zmiňovanou sníženou akumulací anthokyanů a tvorbou hypersenzitivních lézí (HR) na listech cca 6-8 týdnů starých rostlin, záleží však na podmínkách kultivace. Vysokou intenzitou osvětlení ($750\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$) lze projev této mutace (HR léze) částečně potlačit (Kulich et al. 2013). Důvodem vzniku lézí je pravděpodobně akumulace kyseliny salicylové, nicméně názory na tuto problematiku se rozcházejí. Kulich et al. 2013 prokázal zvýšené množství fytohormonů (SA) u mutantů *exo70B1*, což může souviset s poruchou autofagické dráhy, nicméně studie provedená o dva roky později ukázala, že dvojitý mutant *exo70B1/sid2* neschopný akumulace SA vykazuje tvorbu lézí stejně jako mutant *exo70B1* (Zhao et al. 2015). A celý mechanismus, kterým vznikají HR léze, by tak mohl být indukován skrze stále aktivovaný protein TN2, jenž úzce souvisí s indukcí obraných reakcí v důsledku napadení patogenem. Mechanismus aktivace TN2 v důsledku mutace genem *exo70B1* však není doposud objasněn. Mimo HR léze se mutant *exo70B1* vyznačuje zvýšenou resistencí vůči některým patogenům, což přispívá k hypotéze o stále aktivované imunitě.

V současné době byla zásluhou naší laboratoře podhalena interakce proteinu RIN4 s EXO70B1 (Sabol, Kulich, and Žárský 2017). RIN4 je protein lokalizovaný na PM a účastní se imunitních reakcí, konkrétně spuštění PTI (PAMP-triggered immunity) (Mackey et al. 2002; Sabol, Kulich, and Žárský 2017) a reguluje aktivitu protonových pump

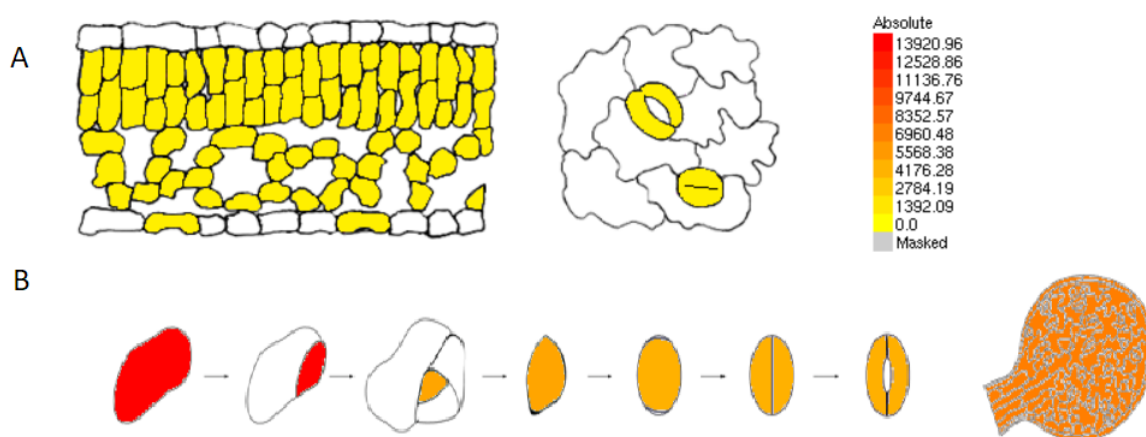
z rodiny AHA (Liu et al. 2009). Pomocí fluorescenčních markerů bylo zjištěno, že RIN4 rekrutuje podjednotku Exo70B1 striktně na PM. Pro mou práci je zásadní fakt, že exprese genu pro RIN4 je nevyšší v průduchových buňkách (Liu et al. 2009) a podjednotka exocystu Exo70B1 hraje patrně důležitou roli při regulaci stomat v rámci obranných reakcí (Sabol, Kulich, and Žárský 2017).

6.1.2 Vliv Exo70B1 na stomata

Navzdory výše zmíněným výzkumům existují pouze druhá studie, skutečně dokazující vliv podjednotky Exo70B1 na dynamiku stomat. Jak již bylo zmíněno výše, podjednotky Exo70 a Sec3 jsou regulovány GTPázami z rodiny Rho, u rostlin tuto funkci zastávají GTPázy ROP (Rho of plants). Díky fúzi ROP2, RIC7 (ROP-interactive Cdc42- and Rac-interactive binding motif-containing protein 7), a Exo70B1 s fluorescenčními proteiny a jejich kombinovanou ko-expresí, byla zjištěna interakce proteinu RIC7 s Exo70B1. ROP2 je zodpovědný za regulaci aktivity RIC7 (Hong et al. 2016). Mutace v proteinu RIC7 má za následek zrychlené otevírání stomat vlivem světla a rovněž urychlené zavírání, indukované kyselinou abscisovou a je tedy negativním regulátorem těchto reakcí, stejnou funkci má i ROP2 (Jeon et al. 2008; Hong et al. 2016) Naproti tomu u *exo70B1* je otevírání stomat vlivem světla omezeno. Ektopická exprese EXO70B1 má naopak za následek vyšší otevřenost než WT. Tento fakt činí z podjednotky EXO70B1 pozitivní regulátor otevírání stomat na světle. Kombinací obou těchto mutací, *exo70B1/ric7* bylo dokázáno, že EXO70B1 je regulován proteinem RIC7, jelikož tento dvojitý mutant vykazuje fenotyp samostatné mutace *exo70B1* (Hong et al. 2016). RopGEF2 (exchange faktor ROP7/ROP2) je rovněž regulován světlem, respektive aktivitou PHYB, a rovněž negativně ovlivňuje otevírání průduchů na světle (W. Wang et al. 2017). Tím byla prokázáno přímé spojení mezi percepcí světla a účinkem ROP2 potažmo i EXO70B1.

V roce 2016 byla pak paralelně publikována studie, odhalující degradaci komplexu Exo70B1 prostřednictvím U-box E3 ubiquitin ligázy PUB18 v proteasomu 26S během zavírání stomat účinkem ABA a mannitolu (simuluje stres vyvolaný suchem) (Seo et al. 2016). V této studii byl rovněž prokázán vliv homologní podjednotky EXO70B2.

Ačkoliv je podle dat dostupných na efpBrowseru (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) gen pro podjednotku Exo70B1 ve stomatech aktivní, doposud nebylo možné fluorescenčními markery indentifikovat jeho přítomnost pod přirozeným promotorem a za běžných podmínek. Nejvyšší exprese *EXO70B1* dle efpBrowseru nastává během vývoje průduchu z meristemoidu. Je tedy nasnadě, že se Exo70B1 pravděpodobně podílí i na vývoji stomat.



Obrázek 8 Znárodnění míry exprese genu *EXO70B1*. Hodnota exprese ve stomatech (A) je 1409 a mezofylu 809. (B) exprese téhož genu při vývoji z meristemoidu. (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

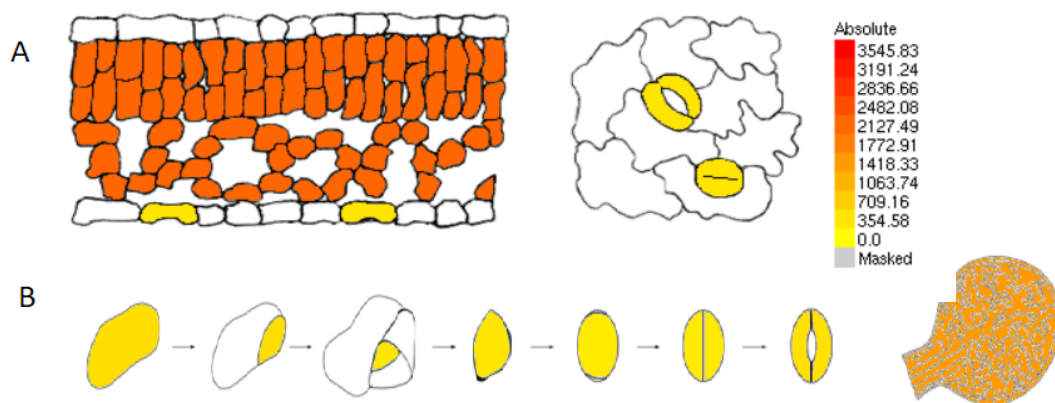
6.2 Vliv podjednotky EXO70B2

Exo70B2 je nejbližší homolog genu Exo70B1, nicméně funkčně se od sebe odlišují. Jedinec mutovaný v genu Exo70B2 nemá žádný, pouhým okem pozorovatelný fenotyp, nedochází k tvorbě HR lézí a akumulace anthokyanů je srovnatelná s WT. O funkci Exo70B2 je známo poměrně málo. Zdá se, že Exo70B2 je zodpovědná za obrané reakce rostlinné imunity. Mutace v tomto genu má za následek zvýšení citlivosti k patogenům, a to jak k houbové, tak i k bakteriální nákaze (Pečenková et al. 2011; Stegmann et al. 2012). Počet kolonií bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* zjištěných u *exo70B2* je vyšší, než u stejně infikovaného WT (Pečenková et al. 2011). Houbové patogeny jsou na rozdíl od

bakteriálních, schopny aktivní penetrace do buňky hostitele. Rostlina se proti tomuto průniku brání vytvářením specifických papil a depozicí kálózy v místě, kde se patogen pokouší proniknout. Formace papily zahrnuje několik fází, jednou z prvních je cílený transport exocytických vezikulů do místa penetrace. Mutace *exo70B2* byla v tomto pozorována masivní akumulace váčků, což značí poruchu v jejich poutání a fúzi (Pečenková et al. 2011). Obdobně jako *Exo70B1*, je i aktivita podjednotky *Exo70B2* regulována E3 ubiquitin ligázou a následně degradována v proteazomu, nicméně v případě druhého zmíněného genu, nesouvisí její ligáza PUB22 s drahou ABA, nýbrž rovněž s imunitní reakcí (Stegmann et al. 2012). Jak bylo zjištěno, PUB22 reguluje reakci vyvolanou rozpoznáním patogenních specifických molekulárních sekvencí (PAMP) (Trujillo et al. 2008; Duplan and Rivas 2014; Stegmann et al. 2012). To částečně objasňuje fenotypový projev *exoB2*. K rozšíření poznatků o aktivitě podjednotky *Exo70B2* přispívá studie z letošního roku. Aktivita podjednotky *Exo70B2* je spojena s exocytickou drahou využívající TGN (trans-golgi network), nyní se ovšem ukázalo, že *Exo70B2* je transportována i do vakuoly, a to pravděpodobně skrze autofagickou dráhu, v důsledku aktivace PTI (PAMP – triggered immunity) (Teh et al. 2018). Docházejí k závěru, že přeměrování *EXO70B2* do autofagické dráhy je způsobeno fosforylací *EXO70B2* na C-konci a tato podjednotka poté není schopna vazby na PM (Teh et al. 2018).

Vliv podjednotky *EXO70B2* na stomata je zmíněn pouze v (Seo et al. 2016), kde je tato podjednotka dávána do souvislosti se zavíráním stomat indukovaným mannitolem. Mutace v tomto genu se projevuje omezenou schopností zavírat průduchy při ošetření mannitolem.

Obdobně jako jeho homolog *EXO70B1*, je na efpBrowseru (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) možné pozorovat jistou hladinu exprese mRNA, a tedy mutace této podjednotky, by měla mít na stomata vliv.



Obrázek 9 Znárodnění míry exprese genu *EXO70B2*. Hodnota exprese ve stomatech (A) je 300 a mezofylu 2153. (B) exprese téhož genu při vývoji z meristemoidu. (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

7 Metodika

7.1 Rostlinný materiál

V této práci byly využívány tyto komerčně dostupné rostliny:

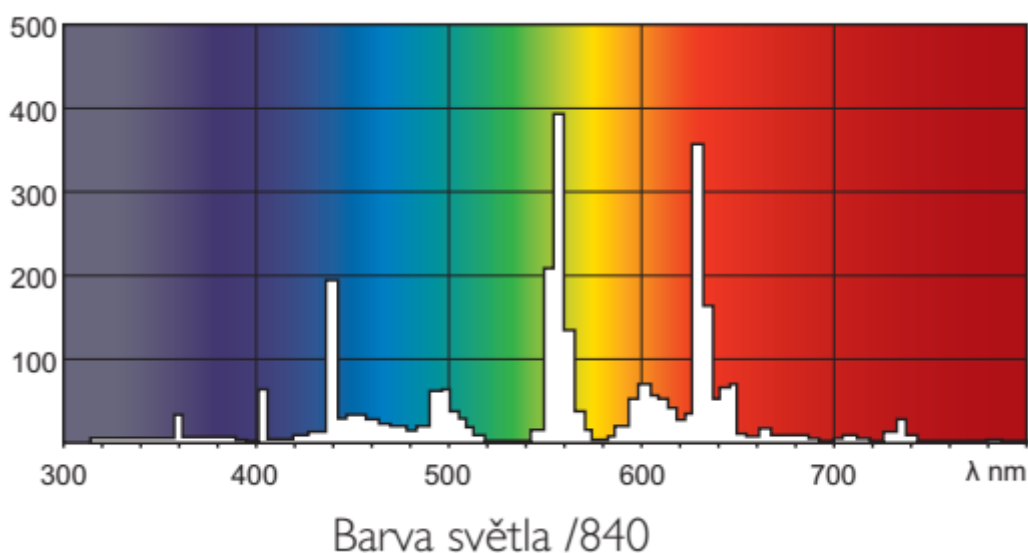
- WT; Columbia 0 (NASC)
- *exo70B1*; Columbia 0 s inzertní mutací v genu AT5G58430, linie GABI_156G02 (NASC)
- *exo70B2-1*; Columbia 0 s inzertní mutací v genu AT1G07000, linie SALK_091877 (NASC)
- *exo70B2-1*; s inzertní mutací v genu AT1G07000, linie SAIL_339-D07 (NASC)

Dvojitý mutant *exo70B1/exo70B2* byl připraven Mgr, Jitkou Ortmannovou PhD, transgenní jedinec pB2::*EXOB2*-GFP byl rovněž připraven Mgr, Jitkou Ortmannovou PhD v (Ortmannová et al., 2018 v přípravě), psec8::*SEC8*-GFP byl připraven v (Fendrych et al. 2010), pB1::*EXOB1*-GFP byl vytvořen v této práci.

7.2 Kultivace rostlin

Standardně sterilizovaná semena *Arabidopsis thaliana* byla vysévána na rašelinové tablety Jiffy a po 24h pobytu v chladové místnosti k navození jarovizace, přenesena do

kultivační komory značky Poly-klima typ M2-250-UV (Poly-klima GmbH, Německo) s krátkodenní délkou fotoperiody (10 hodin světlo, 14h tma) a pravidelnou zálivkou vodou z běžného vodovodu s frekvencí třikrát týdně. Intenzita osvětlujících zářivek Philips TL-D 18/840 (Koninklijke Philips Electronics N.V, Nizozemsko) byla nastavena na 50 % ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), relativní vzdušná vlhkost 75 % a teplota udržována na 20-21°C. Takto kultivované rostliny byly používány v experimentech pro zjištění hustoty stomat, vysoušecím experimentu, měření průduchové konduktance pomocí Li-Cor 6400XT a pro měření rozměrů stomat. Rostliny určené pro fluorescenční mikroskopická pozorování, byly vysévány ve flow-boxu na misky s 0,5 MS médiem a kultivovány *in vitro* kultivační místnosti s dlouhodobou fotoperiodou (16 h světlo/ 8 tma), 23°C a osvětlením o intenzitě $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Obrázek 10 Spektrum, jež poskytuje zářivka Philips TL-D 18/840.

7.3 Vysoušecí experiment

Tento experiment byl v průběhu výzkumu proveden třikrát s různě starými rostlinami. 5-7 týdnů staré rostliny, pěstované v kultivační komoře Poly-klima, byly přeneseny k analytickým vahám a následně bylo z každé sady rostlin ($n=7$ pro každou sledovanou linii) odstrizeno dohromady 10 listů (4.-6. list). Ustřížené řapíky byly ihned ponořeny do vosku, aby bylo zamezeno ztrátě vody touto cestou, a každý list zvlášť zvážen v přesně dodržovaném pořadí, vždy po 1 hodině (celkem 3 série vážení: 1. 2. a 3 hodina). Tím bylo

docíleno možnosti sledovat ztrátu vody v konkrétním listu a případně vyřadit z měření listy, u kterých by byla těsnost voskové zátky narušena. Mezi jednotlivými sériemi vážení byly listy ponechány na papíře abaxiální stranou vzhůru a překryty velkým průsvitným krytem, čímž bylo zabráněno vlivu cirkulace vzduchu. Výsledky byly analyzovány v programu Excel a podrobeny statistickému testu ANOVA s post-hoc HSD Tukey testem.

7.4 Otisk epidermis

Z výsečí ($n=10$ pro každou sledovanou linii) horní třetiny 5.-8. listu rostlin starých 7 týdnů, byl zhotoven lakový otisk. Na pokožku byla nanесena tenká a rovnoměrná vrstva běžného, rychleschnoucího laku na nehty. Po zaschnutí (15 minutách) byl tento nátěr opatrně odstraněn a přemístěn na podložní sklíčko. A pozorováno pod mikroskopem Zeiss Apotome 2 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) s kamerou AxioCam 506 a objektivem EC plan-neofluar 20x/0.50 M27. Snímky byly zpracovány v Zen 2.1 Software (Carl Zeiss GmbH) and Fiji/ImageJ. Analyzováno bylo v průměru 1500 průduchů na WT či mutantní linii.

7.5 Měření konduktance stomat

Pro měření konduktance byl užit přístroj Li-Cor Li 6400XT s 6400-02B LED osvětlením (Li-Cor, Nebraska USA). Pro toto měření byly rostliny staré 7-8 týdnů převezeny z laboratoře ÚEB do laboratoře na katedře KEBR (Přf UK) a ponechány v kultivačním boxu Conviron. Experiment byl rozdělen na tři měření:

- 1) WT vs *exo70B1*
- 2) WT vs *exo70B2*
- 3) WT vs dvojitý mutant *exo70B1/exo70B2*

Každé měření započalo přenesením rostlin z kultivační komory do laboratoře, kde po dobu jedné hodiny probíhala aklimace na místní podmínky. Následně byly u mutantních rostlin i WT vytipovány podobně velké a staré listy (5.-8. nejstarší list), které byly proti sobě, následně střídavě měřeny (WT vs mutant). List byl umístěn do měřicí komory a sevřen čelistmi. Z důvodu nutnosti znát přesný obsah testovaného listu, byla po skončení experimentu označena, odstříhnutá a vyfocena přesná část listové čepele, umístěné v komůrce. Podmínky v měřicí komoře byly konstantě nastaveny na 400 ppm CO², teplotu 21°C, rychlost vzduchu 500 μmol s⁻¹. Změna intenzity ozáření měla 3 fáze: Relativní vlhkost vzduchu nebylo možno regulovat a pohybovala se v rozmezí 25-30 %.

- V 1. (ambientní) části experimentu byla intenzita osvitů 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR po dobu 10 minut.
- V 2. fázi došlo v 10 minutě měření ke skokovému nárůstu intenzity na 2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR po dobu 5 minut.
- Ve 3. fázi bylo v 15 minutě experimentu vypnuto osvětlení až do konce měření (3 minuty).

V každé sledované kombinaci mutace a WT bylo otestováno 6 listů z 5 rostlin (jak pro WT, tak pro mutanta) a všechna měření probíhala v časovém rozmezí od 10-11:00 do 15-16:00. Data z měřicí komory byla sbírána po 5 vteřinách.

Konduktance stomat (g_{sw}) softwarem přístroje počítána podle následujícího vzorce.

$$g_{sw} = \frac{1}{\frac{1}{g_{tw}} - \frac{k_f}{g_{bw}}}$$

Kde g_{tw} je konduktance celého listu a g_{bw} konduktance hraniční vrstvy listu. Faktor k_f udává poměr konduktance průduchů mezi abaxiální a adaxiální stranou listu. Jednotkou konduktance je [$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$] (Li-Cor, 2012, manual).

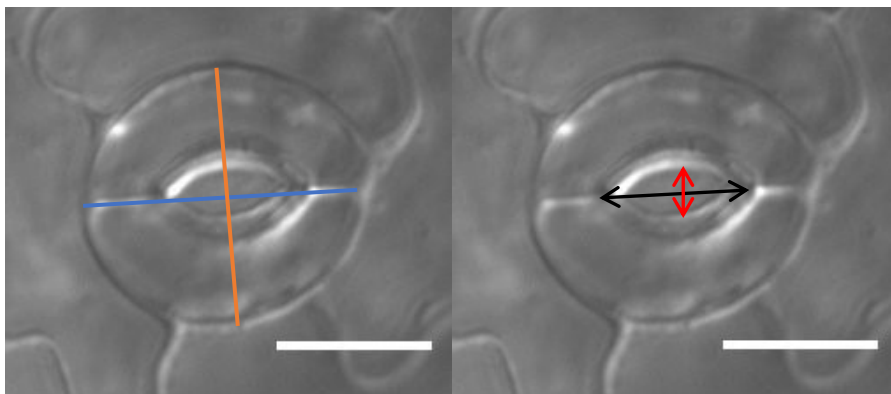
Analýza dat byla provedena v programu Excel. Pro porovnání statisticky signifikantních rozdílů bylo využito buď metody ANOVA s post-hoc HSD Tukey testem, či v případě porovnání párů obyčejný T-test.

7.6 Příprava preparátů pro kvantifikaci rozměrů stomat

7.6.1 Indukce zavírání v důsledku působení tmy

Z horní třetiny 4.-6. nejstarších listů rostlin starých 5 týdnů byla odebrána výseč (pro každou linii 10 výsečí) (Obrázek 12), jenž byla po dobu 3 hodin ponořena do SOB (stomatal opening buffer) pufru (30 mM KCl, 100 mM CaCl₂, and 10 mM MES, pH 6.15) a ponechána v kultivační komoře. Čímž bylo zajištěno otevření stomat na srovnatelně stejnou úroveň. Indukce zavírání byla navozena zakrytím poloviny vzorků alobalovou fólií po dobu 2 hodin. Z každé výseče bylo analyzováno průměrně 50 stomat. Měřenými parametry byly délka

celých stomat (SD), šířka celých stomat (SŠ), délka apertury (AD) a šířka apertury (AŠ) jak v otevřeném, tak v uzavřeném stavu.



Obrázek 11 Měřené parametry stomat. SD (modrá) SŠ (oranžová), AD (černá) AŠ (červená)



Obrázek 12 Místo odebrané výseče.

7.6.2 Mikroskopická analýza stomat

Mikroskopické preparáty, zhotovené za účelem zjištění účinku tmy na otevřenost stomat, byly pozorovány pod mikroskopem Zeiss Apotome 2 s kamerou Axiocam 506 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) a objektivem EC plan-neofluar 20x/0.50 M27. Snímky byly zpracovány v Zen 2.1 Software (Carl Zeiss GmbH) and Fiji/ImageJ (open source). Pro porovnání statisticky signifikantních rozdílů bylo využito metody ANOVA s post-hoc HSD Tukey testem.

Fluorescenčně mikroskopie byla prováděna na ZeissLSM880 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) při použití $\times 63$ oil immersion objektivu. Excitační vlnová délka pro GFP 488 nm for GFP. Snímky byly zpracovány v Zen 2.1 Software (Carl Zeiss GmbH) a Fiji/ImageJ (open source)

7.7 Příprava B1 GFP konstruktů

7.7.1 Izolace genomové DNA

Z homogenizovaných částí listů ekotypu Columbia0 (Col0) byla izolována DNA pomocí DNazolového kitu (DNazol reagent kit, ThermoFisher scientific, USA). Takto připravená DNA byla následně používána jako templát pro PCR.

7.7.2 PCR

Primery byly navrženy tak, aby byla zachována promotorová oblast genu a vynechán stop kodon kvůli fúzi s GFP

Použité primery:

- B1 EcoRI prom : AAGAATTCTGAACGATGTTTCATTTTGGCATAACC
- B1 SalI NOSTOP: AAGTCGACTTTTCTTCCCGTGGTAGTCCCTTTG

Pro PCR bylo použito polymerázy Phusion (New England Biolabs, USA). Reakce probíhala na přístroji Biometra T-personal

Pro 20 μ l se reakce skládala z 4 μ l 5x pufru, 0,5 μ l dNTP, 0,2 μ l levého i pravého primeru, 1 μ l izolované DNA, 0,02 μ l polymerázy, doplněno na výsledný objem 20 μ l demineralizovanou vodou.

Program cyklu byl nastaven na 98 °C prvotní denaturace, poté následoval program opakující se 3x s nižší reasociační teplotou pro umožnění nedokonalého nasedání primeru na templátovou DNA: denaturace 98 °C 30 s, reasociace 55 °C 30 s a elongace 120 s. Následně 27x: Denaturace 98 °C 30 s, reasociace 65 °C 30 s, elongace 72 °C po dobu 120 s.

Závěrečná elongace probíhala při 72 °C po 5 min. a konečné ochlazení na 4°C.

Fragmenty z produktu PCR byly přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Německo) kolonek a štěpeny enzymy EcoRI a SalI (NEB, USA). Následně byly fragmenty odseparovány na gelu pomocí elektroforézy. Složení gelu: 1 % agarosy (0,5g), 50 μ l TBE pufru, 5 μ l ethidium bromidu, DNA z digesce byla obarvena 6x koncentrovanou (*loading dye*) barvou. Po proběhnutí elektroforézy, byl gel vyfocen pod UV

lampou pro kontrolu správné délky fragmentu. Ty byly následně vyříznuty a přečištěny podle návodu pro QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Německo).

7.7.3 Ligace a transformace *E. coli*

Výsledné purifikované fragmenty a EcoRI/XhoI naštěpený pENTR3C vektor (ThermoFisher scientific, USA) byly ligovány pomocí enzymu T4DNA ligázy (ThermoFisher scientific, USA). Reakce probíhala po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Výsledná DNA byla transformována do kompetentních bakterií *Escherichia coli* (získané ze sbírek ÚEB AV ČR) za použití metody teplotního šoku: 30 minut inkubace na ledu, 42 °C po dobu 45 s a zpětné ochlazení.

Bakterie byly rozpuštěny v 100 µl LB media a kultivovány 2 h při 37°C.

Suspenze bakterií byla následně vyseta na plotny s pevným LB mediem a antibiotikem (kanamycin) a kultivována přes noc při 37 °C

Narostlé kolonie byly odebrány a přeneseny do tekutého LB media s kanamycinem a kultivovány na třepačce po přes noc při 37°C. Z bakterií byl posléze QIAprepSpin Miniprep Kitem (Qiagen, Německo) získán pENTR vektor pro další práci. Správnost sekvence byla ověřena komerčním sekvenováním (GATC Biotech, Německo).

7.7.4 Přenesení vektoru do pGWB4 transformace *E. coli*

Promotor s kódující oblastí z pENTR vektoru byl podle návodu přenesen do destinačního binárního vektoru pGWB4 LR reakcí užitím Gateway LR Clonase Plus Enzyme Mix. pGWB4 je binární vektor a lze jej propagovat jak v *E. coli* tak v *A. tumefaciens*, který umožňuje pozdější manipulaci s genomem rostlin. (Nakagawa et al. 2007)

Vektor byl opět transformován do *E. coli* výše popsaným postupem. Tyto bakterie byly po kultivaci a opětovnému přečištění plasmidu analyzovány štěpením a na elektroforéze následně bylo zjištěno, která z příslušných kolonií poskytuje fragmenty odpovídajících délek.

7.7.5 Transformace *A. tumefaciens*

Vektor z odpovídajících kolonií byl elektroporací transformován do elektrokompetentních bakterií *A. tumefaciens* GV3013 (NASC, UK). Transformované bakterie

byly následně vysety na misky s LB médiem a příslušným antibiotikem (rifampicin, gentamycin, hygromycin a kanamycin) a při 28 °C po 3 dny inkubovány.

7.7.6 Transformace rostlin

Rostliny byly transformovány metodou floral dip (Clough and Bent 1998)

Narostlé kolonie Agrobakteria byly odebrány z kultivačních misek, resuspendovány v tekutém LB s antibiotiky a kultivovány přes noc při 28°C. Další den byla tato kultura přemístěna do 300 ml čerstvého LB media a kultivována další noc. Roztok byl následně centrifugován po 15 min při 6000 rpm. Výsledný pelet byl rozpuštěn v 0,3 litru roztoku 10 % sacharózy a 0,05 % silvetu. Rostlinám byly následně opatrně ponořeny květní stvoly do roztoku po dobu 30. Takto transformované rostliny byly přeneseny do kultivační místnosti, kde dokončily svůj životní cyklus. Vyprodukovaná semínka byla sklizena, vymražena v mrazáku (-20°C) po 24 h, standardním způsobem sterilizována, ponechána po 24 hodin v lednici a následně vyseta na misky s 0,5 MS médiem a selekčními antibiotiky kanamycinem a hygromycinem, kvůli rezistenci vnesené Agrobakteriem, a claforanem, pro prevenci růstu přežívajícího Agrobakteria. Kultivace *in vitro* se podmínkami nelišila od ostatních takto pěstovaných rostlin.

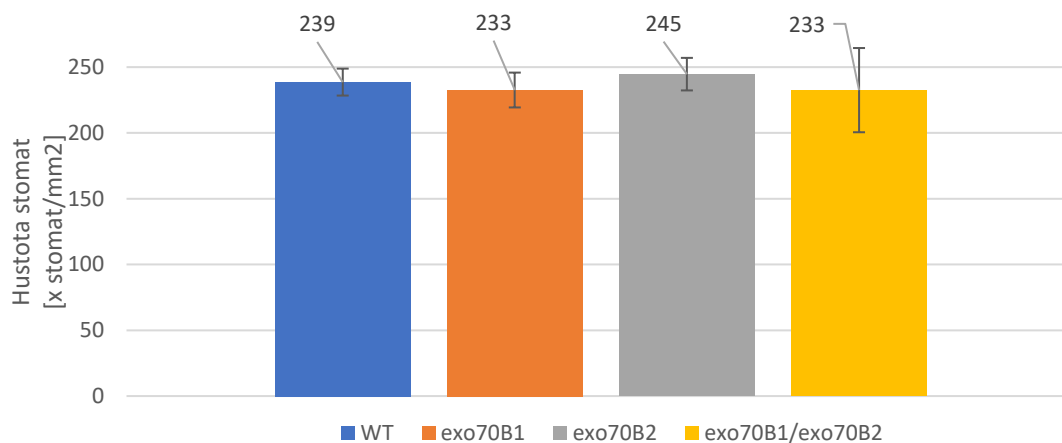
8 Výsledky

8.1 Hustota průduchů

Hustota průduchů (Graf 1) byla změřena na výsečích z horní třetiny listu (viz Obrázek 13) V této části listu, je četnost zakládání nových průduchů nízká a epidermální buňky jsou již plně vyvinuty, variabilita četnosti pozorovatelných stomat, vzniklá při plošném snímání změnami roviny ostrosti, je proto snížena na minimum. Pro každou mutaci bylo analyzováno přes 1800 stomat. Výsledky jsou analyzovány metodou ANOVA s post-hoc HSD Tukey testem a neprokazují žádný statisticky významné rozdíly hustoty průduchů mezi WT a jednotlivými mutanty. Mírně zvýšenou hustotu oproti ostatním jedincům vykazuje pouze mutant *exo70B2*. Nejvyšší variabilitu v počtu stomat lze nalézt u dvojitého mutantu, nicméně tento rozdíl je zřejmě způsoben jinak pořízených snímků.



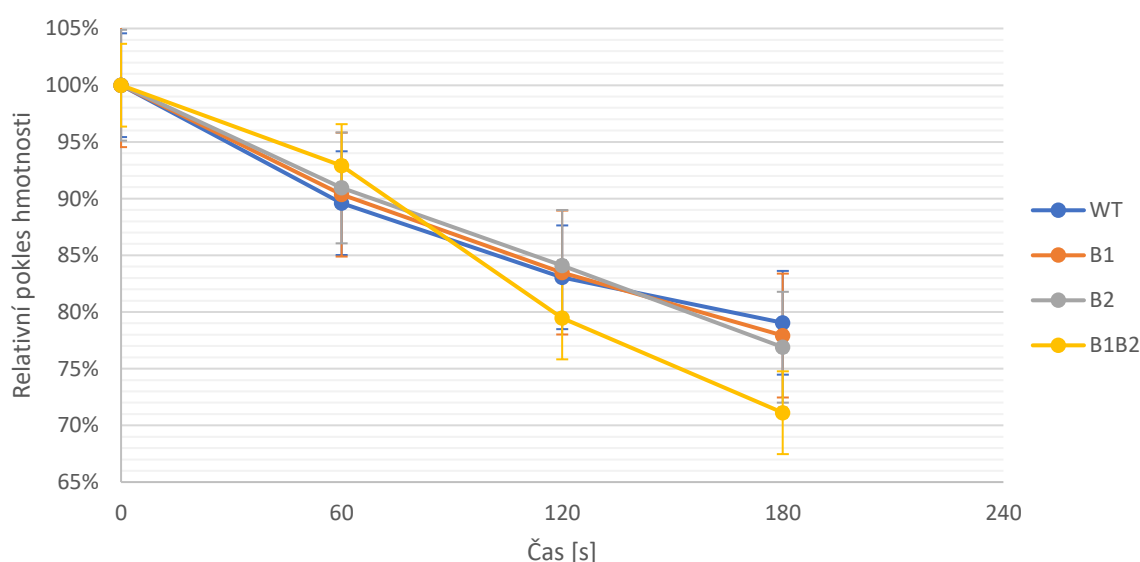
Obrázek 13. Vyznačení použité výseče.



Graf 1 Znárodnění hustoty průduchů (počet stomat na mm²) včetně směrodatných odchylek u WT (modrá), mutantu *exo70B1* (oranžová), *exo70B2* (šedivá) a mutantu s oběma defekty *exo70B1/exo70B2* (žlutá). Statistický test ANOVA s post-hoc HSD Tukey neodhalil žádné signifikantní rozdíly mezi mutanty a WT.

8.2 Vysoušecí experiment

Pro ověření, zda má mutace *exo70B1*, *exo70B2* a dvojitý mutant vliv na stomatální dynamiku a metabolické změny vzniklé v důsledku excise listu, byl proveden vysoušecí experiment (Graf 2). Statisticky signifikantní rozdíly mezi mutanty a WT nejsou, dvojitý mutant však vykazuje náhlý pokles hmotnosti v 120 minutě experimentu. Tento pokus byl třikrát opakován na různě starých rostlinách v rozpětí 5-7 týdnů. A ačkoliv statistika nikdy neprokázala signifikantní rozdíly, fenomén náhlého poklesu hmotnosti dvojitého mutanta je pozorovatelný v každém opakování. Třetí experiment (prezentovaný) byl proveden s největší robustností (10 listů od každého mutanta i wt) a s rostlinami stáří 5 týdnů.



Graf 2 Relativní úbytek váhy v čase. WT (modrá), *exo70B1* (B1, oranžová), *exo70B2* (B2, šedivá), dvojitý mutant *exo70B1/exo70B2* (B1B2, žlutá). Úsečky směrodatných odchylek zachovávají barevné značení. Pro ověření statisticky signifikantních rozdílů bylo užito metody ANOVA s post-hoc HSD Tukey testem. Výsledné rozdíly nejsou signifikantní.

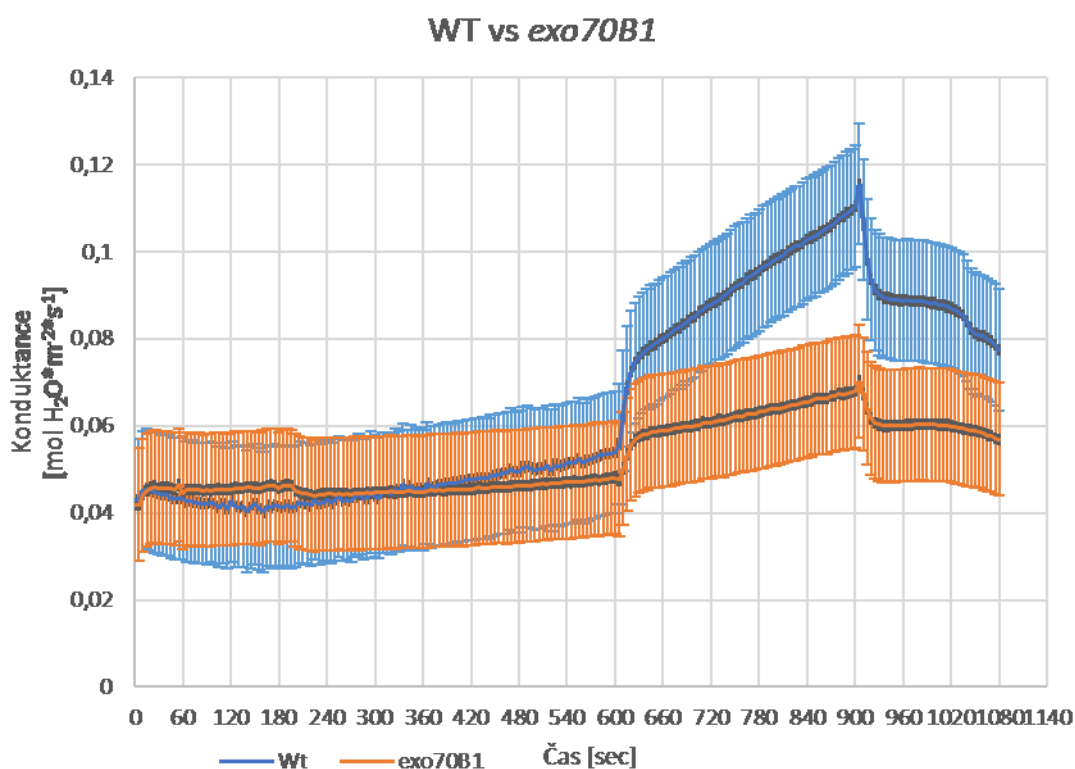
8.3 Měření konduktance stomat

Pro kvantifikaci otevřenosti a dynamiky stomat za ambientních podmínek a za extrémní intenzity osvětlení, byl využit multifunkční přístroj Li-Cor LI-6400XT, jenž velice přesně analyzuje výměnu plynů mezi listem a okolím. Vodivost stomat neboli konduktance,

je dána mírou transpirace celé plochy listu, od které je odečtena transpirace hraniční vrstvy. Výsledná hodnota je poté korelována rozložením stomat na vrchní a spodní straně listu (viz. metody). U *Arabidopsis* jsou průduchy přítomny pouze na spodní, abaxiální straně listu. Z důvodu organizace experimentu (viz. metody), jsou výsledky prezentovány v oddělených grafech a každý zkoumaný mutantní fenotyp je srovnáván se svou vlastní kontrolou.

8.3.1 WT versus *exo70B1*

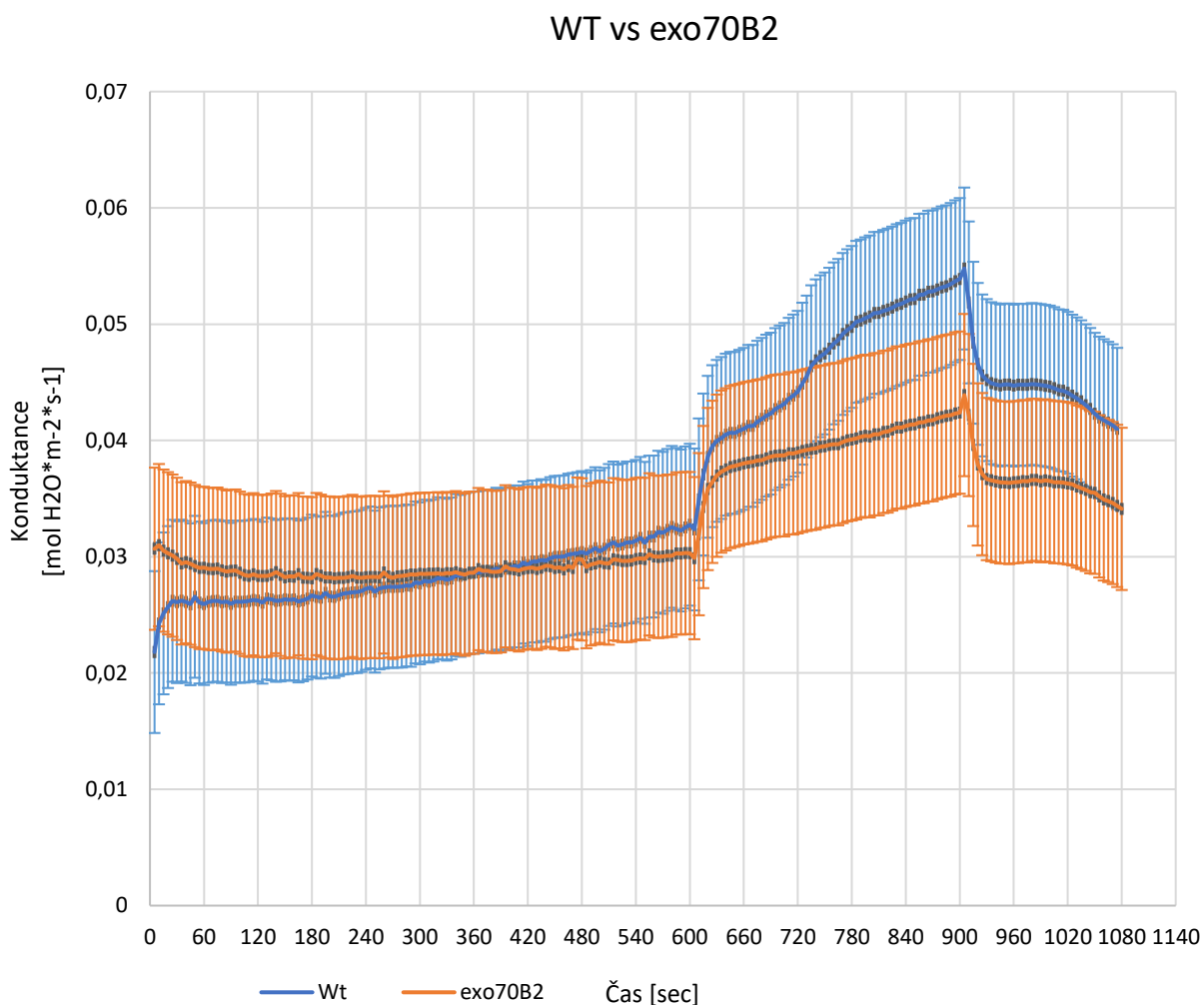
Z průběhu reakce znázorněné v grafu 3 je patrné, že ambientní hodnoty konduktance (0-600 vteřina) WT i mutanta jsou srovnatelné a zásadní změny nastávají až při změně intenzity osvětlení z 150 na 2500 (600-900 vteřina), kde se *exo70B1* projevuje zpomaleným nárůstem vodivosti stomat. Rovněž zpětný pokles, indukovaný vypnutím světelného zdroje (900-1080 vteřina), je u *exo70B1* oproti WT zpomalen. Je možné tedy konstatovat, že rychlost otevírání průduchu, či zavírání průduchu je v důsledku mutace *exo70B1* nižší.



Graf 3 Měření konduktance WT vs *exo70B1*. Časový úsek 0-600 sec odpovídá intenzitě osvětlení 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR. V úseku 600-900 sec byla skokově změněna intenzita na 2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR. Křivky představují mediány všech (v daném experimentu) měřených jedinců ($n=6$)

8.3.2 WT versus *exo70B2*

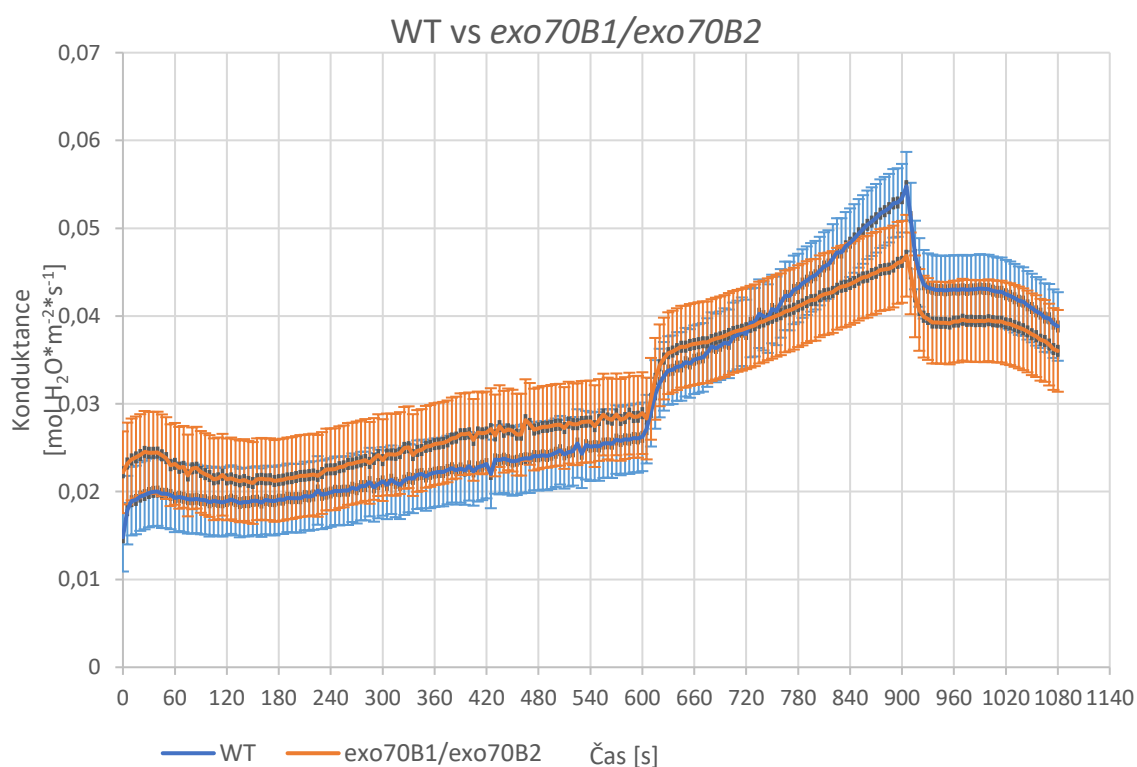
Graf 4 ukazuje průběh experimentu pro WT a *exo70B2*. Vliv mutace podjednotky *exo70B2* je víceméně analogický s předchozím měřením. Nárůst vodivosti stomat, během zvýšení intenzity osvětlení, je oproti WT zpomalen. Rozdílný tvar křivky WT (od předchozího experimentu) je způsoben vyšší variabilitou v chování měřených jedinců.



Graf 4 Graf měření konduktance WT vs *exo70B2*. Časový úsek 0-600 sec odpovídá intenzitě osvětlení $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR. V úseku 600-900 sec byla skokově změněna intenzita na $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR. Křivky představují mediány všech (v daném experimentu) měřených jedinců ($n=6$).

8.3.3 WT versus *exo70B1/exo70B2*

Přítomnost obou mutací má odlišný vliv na chování stomat, než je tomu u samostatných mutací. Z Graf 5 je patrné, že dvojitý mutant *exo70B1/exo70B2* více koreluje s průběhem WT. Ambientní ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR) hodnoty konduktance (0-600 s) jsou u dvojitého mutantu oproti WT lehce navýšeny. Reakce na intenzivní ozáření (600-900 s) se projevuje pomalejším nárůstem konduktance stomat, nicméně rozdíl oproti WT již není tak markantní, jako u předchozích měření. Křivka poklesu vodivosti průduchů, v závěrečné temnostní fázi experimentu (900-1080 s), je téměř totožná s kontrolou (WT). Bezpochyby je tedy možné konstatovat, že jak mutace *exoB1*, tak i mutace *exo70B2* má vliv na rychlost otevírání stomat v důsledku změn intenzity osvětlení. Dvojitý mutant zatím neznámým způsobem částečně potlačuje vliv jednotlivých mutací a svou dynamikou se tedy více podobá WT.



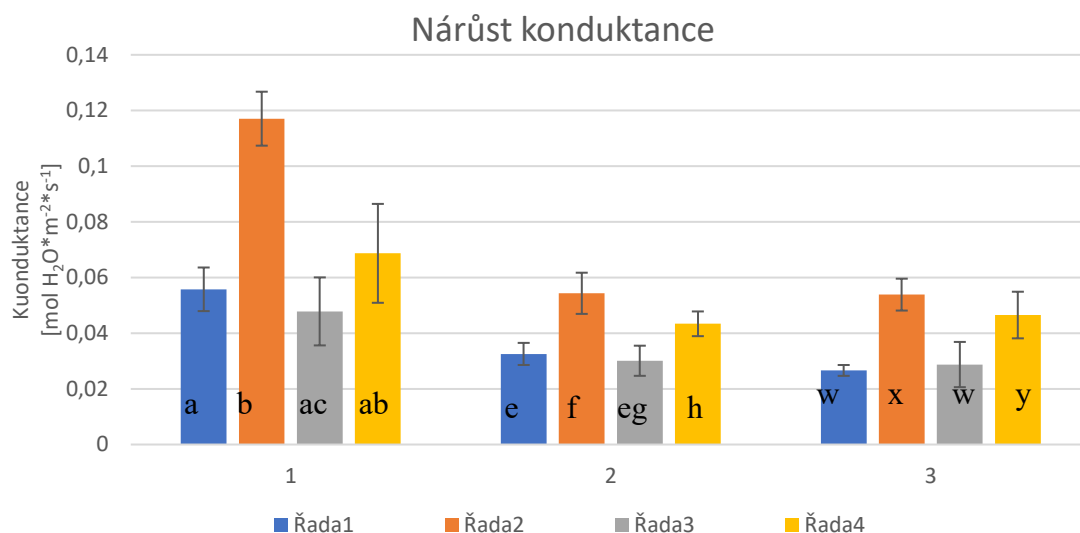
Graf 5 Graf měření konduktance stomat WT vs *exo70B1/exo70B2*. Časový úsek 0-600 sec odpovídá intenzitě osvětlení $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR. V úseku 600-900 sec byla skokově změněna intenzita na $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR. Křivky představují mediány všech (v daném experimentu) měřených jedinců ($n=6$).

8.3.4 Nárůst konduktance

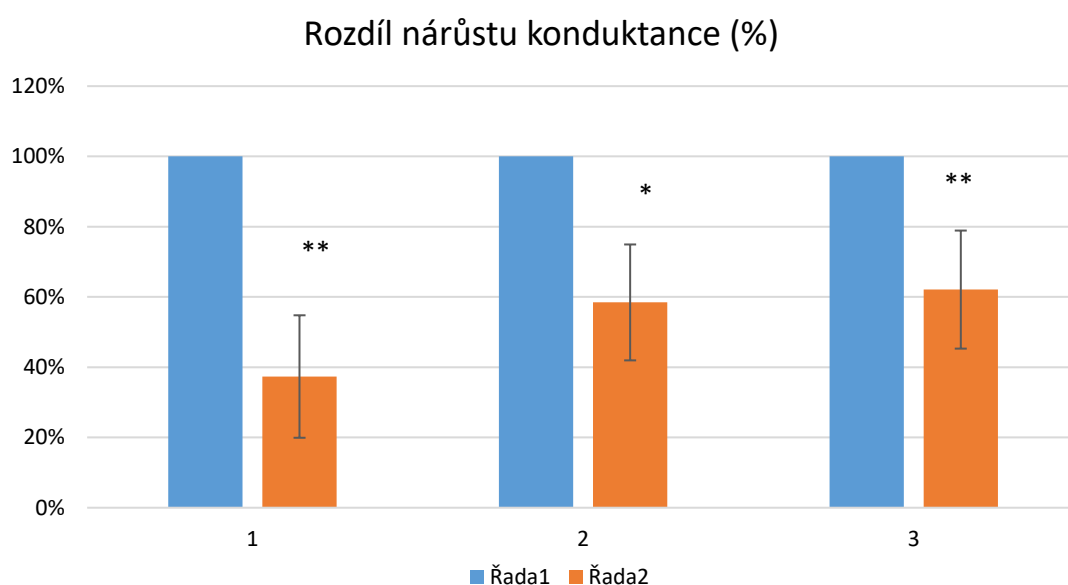
Kvantifikovaná data konduktance stomat při osvětlení o intenzitě $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR a $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR jsou porovnány v Graf 6 a Graf 7. Velikost konduktance představuje medián 5 posledních hodnot naměřených před změnou intenzity světla ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR na $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR) posledních 2 hodnot před změnou intenzity ($2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR na $0 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR) pro každé měření ($n=6$). Všechny tři experimenty (1, 2, 3) byly zvlášť analyzovány metodou ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem¹. Výsledky této kvantifikace překvapivě ukazují, že míra vodivosti stomat u všech mutantů se za ambientních podmínek ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR) výrazně neodlišuje od WT a případné drobné rozdíly nejsou signifikantní v žádném z experimentů. Lze tedy předpokládat, že mutace *exo70B1*, *exo70B2* ani jejich kombinace nemá vliv na dynamiku stomat za běžných podmínek. Statistické testy naopak vyvracejí možnost, že nárůst konduktance, vznikající během zvýšení intenzity osvětlení, byl projevem pouhé náhody (Graf 6). Zásadní informací získanou během tohoto experimentu, je statistické potvrzení odlišné reakce a dynamiky průduchů u mutantů *exo70B1* a *exo70B2* v závislosti na intenzitě světla, jejichž maximální dosažená hodnota konduktance se signifikantně odlišuje od WT, nicméně u dvojitého mutantu *exo70B1/exo70B2* vůči WT statisticky signifikantní není. Tento fakt tak podporuje hypotézu o potlačení fenotypového projevu přítomností obou mutací dohromady.

Nárůst vodivosti průduchů v reakci na změnu intenzity osvětlení, je vypočten jako rozdíl konduktance při intenzitě $2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR, kde hodnota WT odpovídá 100 % (Graf 7). Jednotlivé experimenty jsou v grafu prezentovány odděleně (1, 2, 3). V případě WT vs *exo70B1* dosahuje nárůst vodivosti průduchů mutantu pouhých 37% nárůstu WT, zatímco u *exo70B2* a *exo70B1/exo70B2* je navýšení konduktance téměř dvojnásobné. Pro *exo70B2* je rovno 58 %. WT a dvojitý mutant *exo70B1/exo70B2* nabývají 62 %. Pro ověření, zda jsou naměřená data statisticky signifikantní, bylo pro každý experiment použito testu T-testu, který odhalil vysokou míru signifikance rozdílu ($p < 0,001$) pro WT vs *exo70B1* a rovněž v případě WT vs *exo70B1/exo70B2*. V experimentu WT vs *exo70B2* je míra signifikance nižší ($p < 0,05$)

¹ V grafech 6-9 jsou tedy vždy přítomny tři spolu nesouvisející statistické testy, každý jednotlivý experiment (1, 2, 3) disponuje vlastním testem, jehož výsledky nejsou porovnávány s ostatními experimenty.



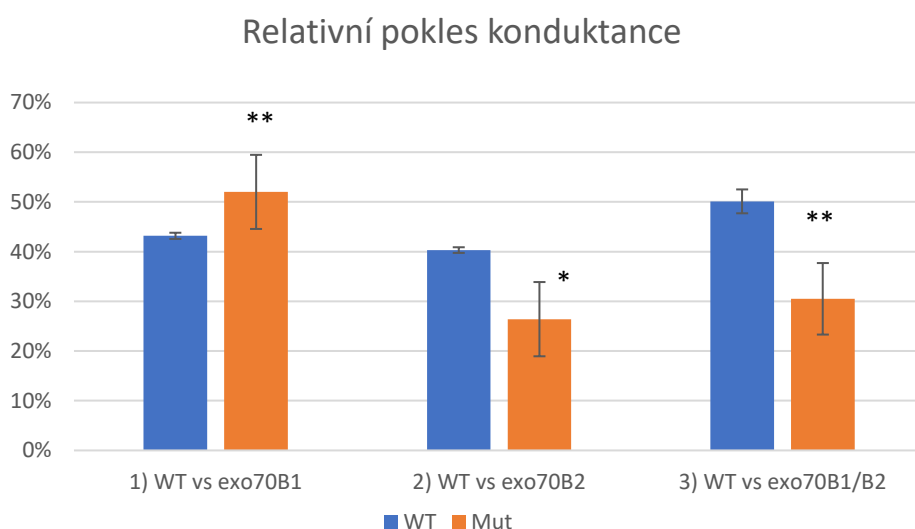
Graf 6 obsahuje tři separátní experimenty (1, 2, 3), kde je vždy porovnáván fenotyp dané mutace proti WT. Barvy označují hodnotu konduktance stomat pro každý experiment. WT při osvětlení o intenzitě 150 FAR (WT 150 FAR = Modrá), WT při intenzitě 2500 FAR (WT 2500 FAR = oranžová). Mutantní linie o intenzitě 150 FAR = šedivá, mutantní linie o intenzitě 2500 FAR = žlutá. Každý experiment (1, 2, 3) byl otestován statistickou metodou ANOVA s post-hoc HSD



Graf 7 Nárůst vodivosti (konduktance) stomat v důsledku změny osvětlení. Rozdíl WT hodnot při intenzitě osvětlení 2500 a 150 představuje 100 % v jednotlivých experimentech (1, 2, 3). Graf zahrnuje tři separovaná měření: 1) WT vs *exo70B1*, 2) WT vs *exo70B2*, 3) WT vs *exo70B1/exo70B2* včetně směrodatných odchylek. Písmeny jsou znázorněny (T-test) statisticky signifikantní rozdíly pro jednotlivé páry (** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$). Výsledek statistického testu je platný pouze v příslušném experimentu (1, 2, 3). Hodnoty v jednotlivých měřeních (1, 2, 3) nejsou mezi sebou napříč experimenty (1, 2, 3) porovnávány a není tak mezi nimi žádná statistická souvislost.

8.3.5 Pokles konduktance

Procentuální pokles konduktance, v důsledku vypnutí světelného zdroje znázorňuje graf 8. Opět je možné vidět, že dynamika průduchů *exo70B1* doznává největších změn. V důsledku vypnutí světelného zdroje, konduktance *exo70B1* poklesá o 52 % od původní hodnoty (při intenzitě 2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Jeho homolog *exo70B2* vykazuje naopak nejmenší rozdíl v poklesu konduktance, o 26 %. Úpadek vodivosti stomat u dvojitého mutantu činí 31 %. WT poklesá ve všech třech měřeních o 40-50 %. U všech tří testovaných párů je rozdíl statisticky signifikantní.



Graf 8 Relativní pokles konduktancei ve vztahu k předchozímu nárůstu. Pro zjištění zda jsou rozdíky mezi mutantem a jeho příslušným WT signifikantní, bylo užito T-Testu. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

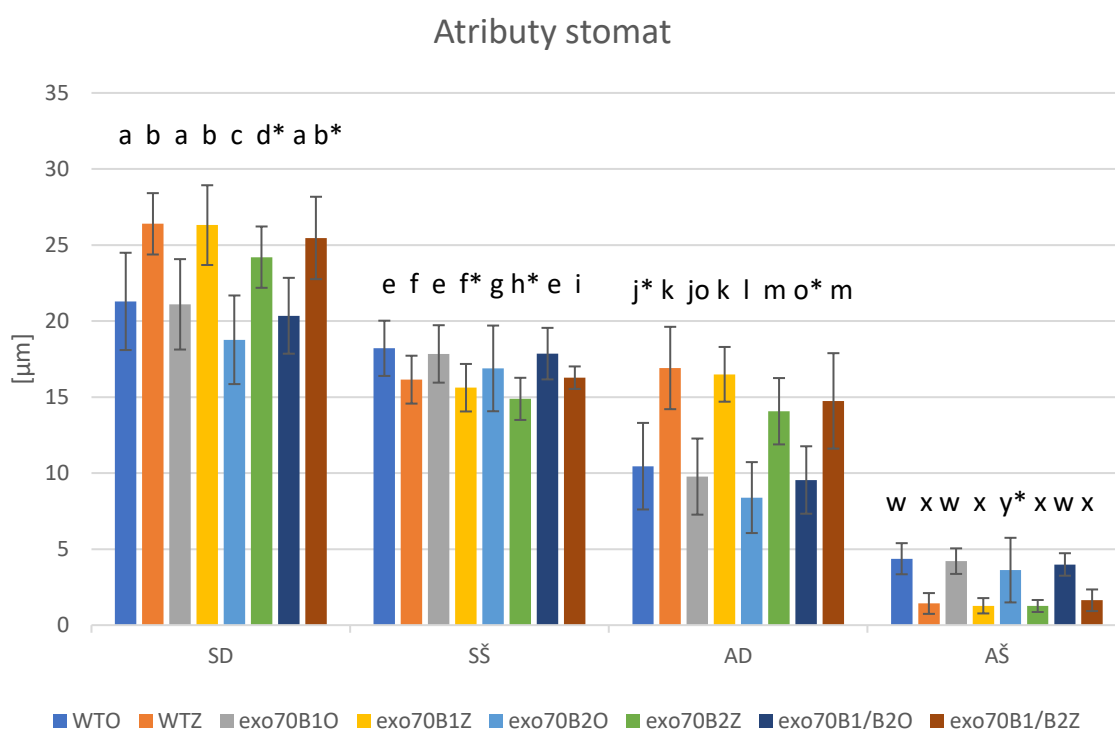
8.4 Změna proporcí stomat: světlo vs tma

8.4.1 Velikost průduchů a apertury

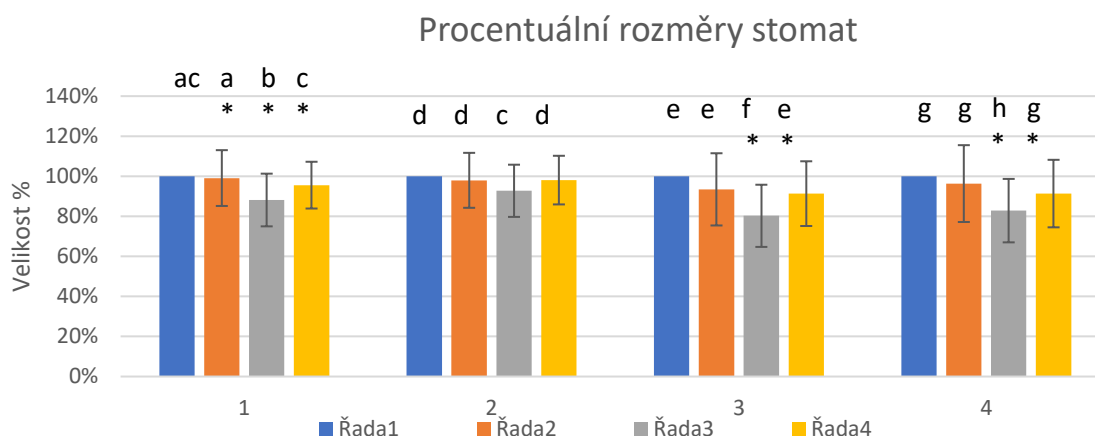
Pro ověření, zda mají mutace *exoB1*, *exoB2* a jejich kombinace nějaký vliv na velikost průduchů či apertury, byla provedena série mikroskopických měření na 5 týdnů starých rostlinách. Analyzovány byly dvě skupiny vzorků. První část použitá pro analýzu otevřených průduchů byla ponechána v kultivační komoře po 3h v SOB pufu (viz metody), uzavírání stomat v druhé skupině bylo navozeno zakrytím nádoby se vzorky na 2 hodiny. Nicméně za tuto dobu nedošlo k úplnému zavření stomat a průduchová štěrbiná byla stále patrná. Hlavními sledovanými atributy je délka a šířka celého průduchu, rovněž i délka a šířka

stomatální apertury. Kvantifikace jednotlivých atributů otevřených, zavřených stomat je prezentována v Graf 9. Z výsledků vyplývá, že v průběhu otevírání dochází, u všech sledovaných jedinců, ke zkrácování délky celého průduchu, a naopak vzrůstá jeho šířka. Stejným změnám podléhá pohyb samotné apertury. Konkrétní rozdíly jsou rozebírány dále.

V otevřeném stavu má mutant *exo70B2* v porovnání s ostatními signifikantně nejmenší stomata. Délka celého průduchu (SD) se odlišuje od hodnoty WT téměř o 12 % a šířka (SŠ) o 7 %, rovněž i velikost štěrbinu je v otevřeném stavu nejmenší, délka apertury (AD) i její šířka (AŠ) dosahují pouze 80 % velikosti WT. Tento rozdíl je od WT ve všech případech statisticky signifikantní ($p < 0,01$). Pozměněnou velikostí apertury se projevuje rovněž dvojitý mutant, kde je její délka oproti WT signifikantně ($p < 0,05$) menší o 8,5 % (Graf 10). U zavřených průduchů je efekt zcela analogický k průduchům otevřeným, proto zde není graf prezentován.



Graf 9 představuje reálné rozměry [μm] stomat v otevřeném (přípona O) a zavřeném stavu (přípona Z). Jednotlivé atributy sledovaných jedinců: délka celého průduchu (SD), šířka celého průduchu (SŠ), délka apertury (AD) a šířka apertury (AŠ), byly odděleně otestovány metodou ANOVA s post-hoc HSD testem pro potvrzení rozdílu mezi otevřeným a zavřeným stavem. Různými písmeny jsou označeny statisticky signifikantní výsledky pro $p < 0,01$. * značí nižší hladinu signifikance $p < 0,05$.

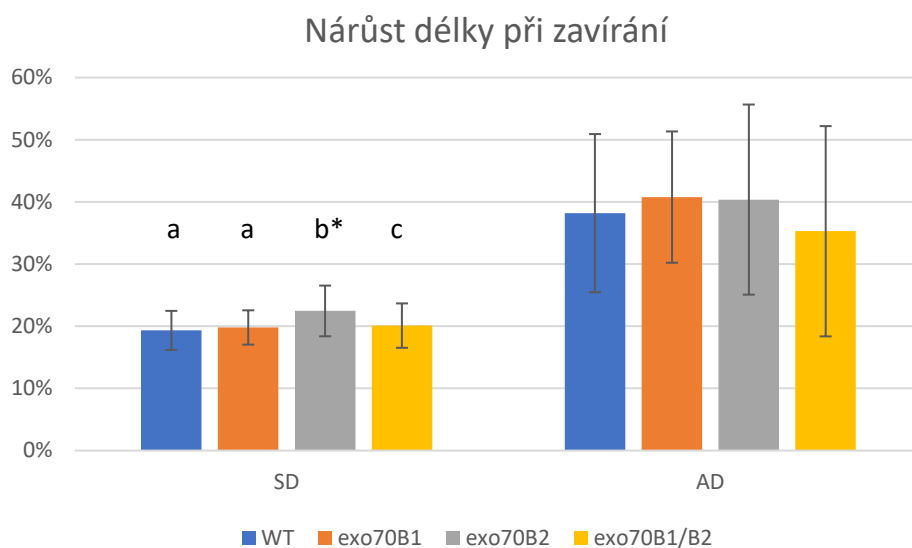


Graf 10 představuje rozdíl v attributech stomat vůči WT (100 %) pouze v otevřeném stavu. WT znázorňuje (modrá), *exoB1* (oranžová), *exoB2* (šedivá), *exoB1/B2* (žlutá). Jednotlivé atributy, délka celého průduchu (SD), šířka celého průduchu (SŠ), délka apertury (AD) a šířka apertury (AŠ), byly odděleně otestovány metodou ANOVA s post-hoc HSD testem. Různými písmeny jsou označeny statisticky signifikantní výsledky pro $p < 0,01$. * značí nižší hladinu signifikance $p < 0,05$.

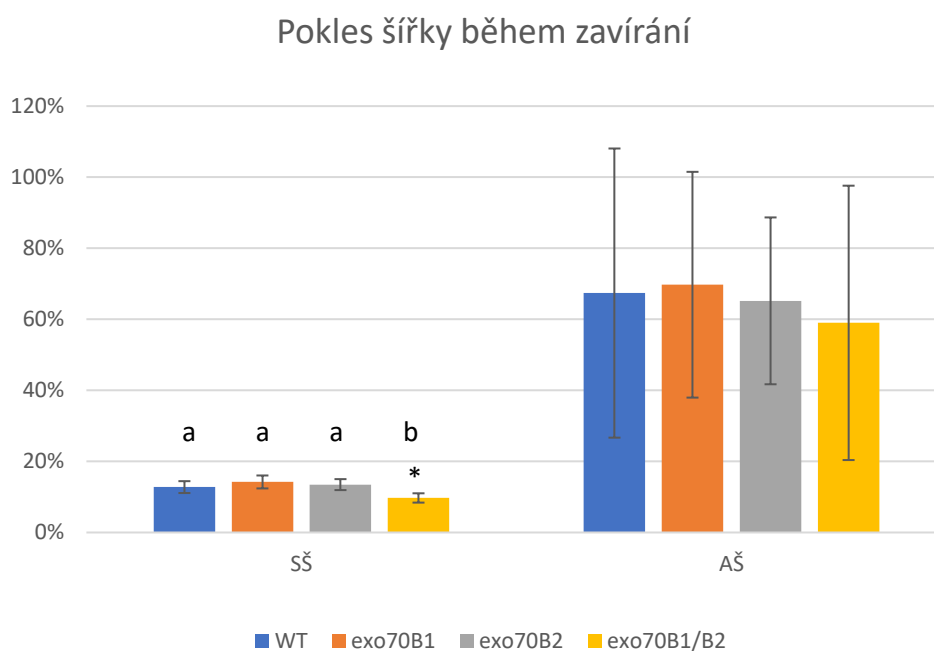
8.4.2 Relativní změny celých průduchů a apertury

Relativní nárůst a pokles sledovaných atributů stomat, je prezentován v Graf 11 a Graf 12. Největší procentuální nárůst délky (SD) v důsledku zavírání stomat, je překvapivě pozorovatelný u *exo70B2*, o 22 %, tento výsledek je statisticky signifikantní ($p < 0,05$). V případě změny délky samotné apertury (AD) se nejvíce odlišuje dvojitý mutant *exo70B1/exo70B2*, u něhož dochází k nárůstu o 35 %. U WT se délka apertury, v důsledku zavření průduchu, prodlouží o 38 % a u samostatných mutací *exo70B1* a *exo70B2* o 40 %. Nicméně tyto rozdíly nejsou statisticky signifikantní a oproti rozměru SD jsou zatíženy značnou odchylkou.

Mutant *exo70B1/exo70B2* vykazuje, v důsledku zavření průduchu, nejmenší snížení šířky celého průduchu pouze 10 % (Graf 12). WT a ostatní mutanti snižují velikost šířky stoma v průměru 13,8 %. Změna hodnot v šířce apertury je zatížena značně vysokou směrodatnou odchylkou, a statistické testy neodhalily signifikantní rozdíly mezi testovanými jedinci. K největší změně v šířce apertury dochází u *exo70B1*, kde ŠA poklesá o 70 % původní šířky. Nejméně jsou průduchy zavřeny u *exo70B1/exo70B2*, který mění ŠA o 58 %.



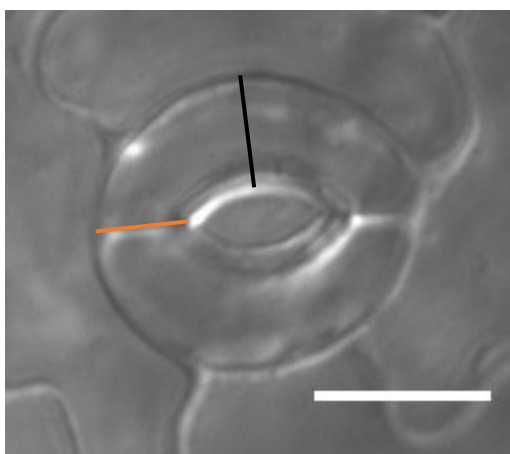
Graf 11 Relativní nárůst délky celého stoma (SD) a apertury (AD). Písmenky jsou odlišeny statisticky signifikantní výsledky pro $p < 0,05$. Každý atribut (SD) a (AD) byl zvlášť podroben testu ANOVA s post hoc HSD Tukey testem.



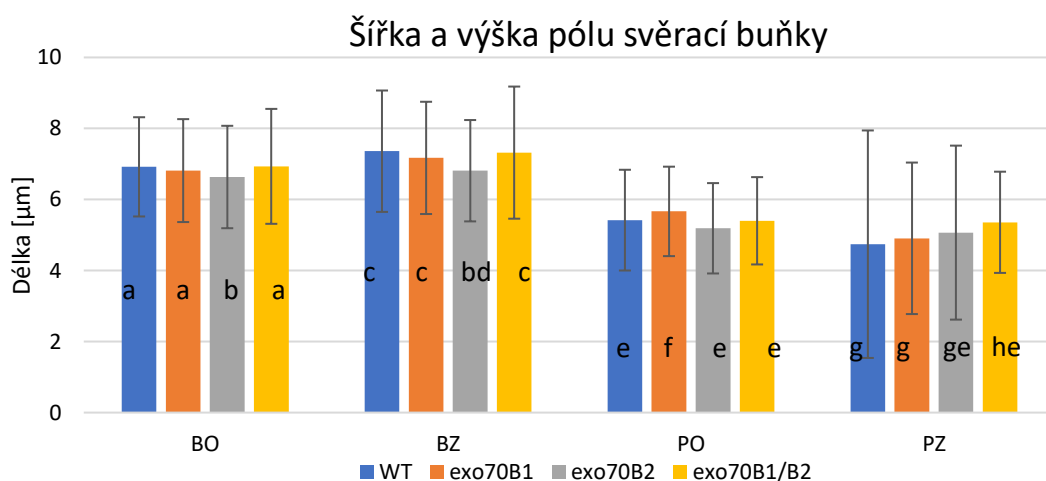
Graf 12 Relativní pokles šířky celého stoma (SŠ) a apertury (AŠ). Statisticky signifikantní výsledky pro $*p < 0,05$. Každý atribut (SŠ) a (AŠ) byl zvlášť podroben testu ANOVA s post hoc HSD Tukey testem.

8.4.3 Proporce a tvar svěřací buňky

Z předchozí analýzy vyplývá, že projev mutací má vliv na velikost celého průduchu. Pro objasnění, které části stomat jsou v důsledku mutace postiženy nejvíce, byla vypočítána šířka samostatné svěřací buňky a výška pólů (viz Obrázek 14), jako rozdíl poloviny délky průduchu a apertury (výška pólu) či rozdíl poloviny šíře průduchu a apertury (šířka svěřací buňky) v zavřeném a otevřeném stavu. Poté byly sledovány a kvantifikovány jejich změny, vzniklé v důsledku zavírání stomat (Graf 13).

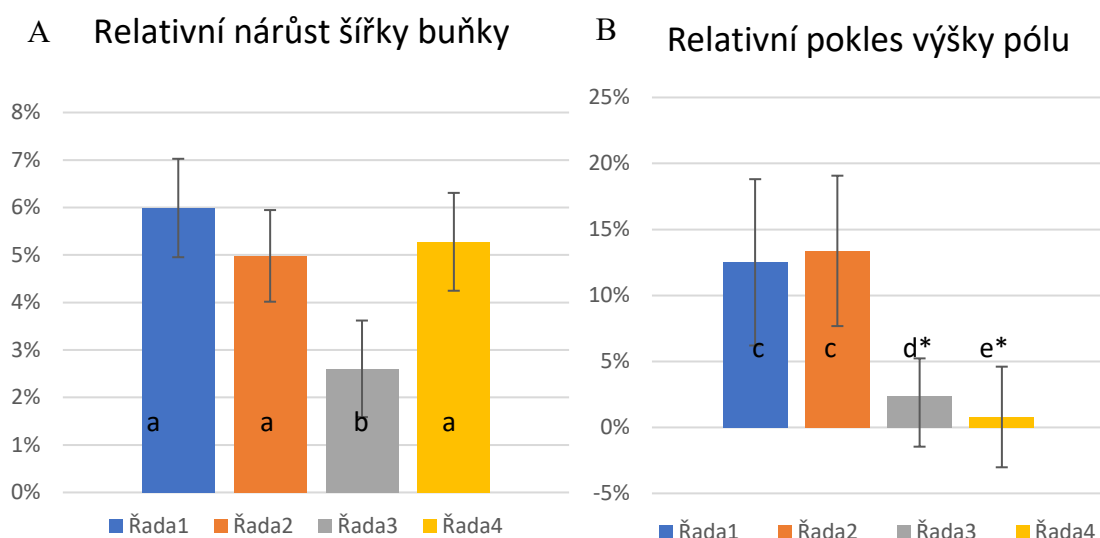


Obrázek 14 Vyznačení měřených parametrů. Šířka průduchové buňky (B-černá) a výška pólu (P-oranžová), tyto rozměry platí i pro zavřená stomata. Úsečka= 10 μm .



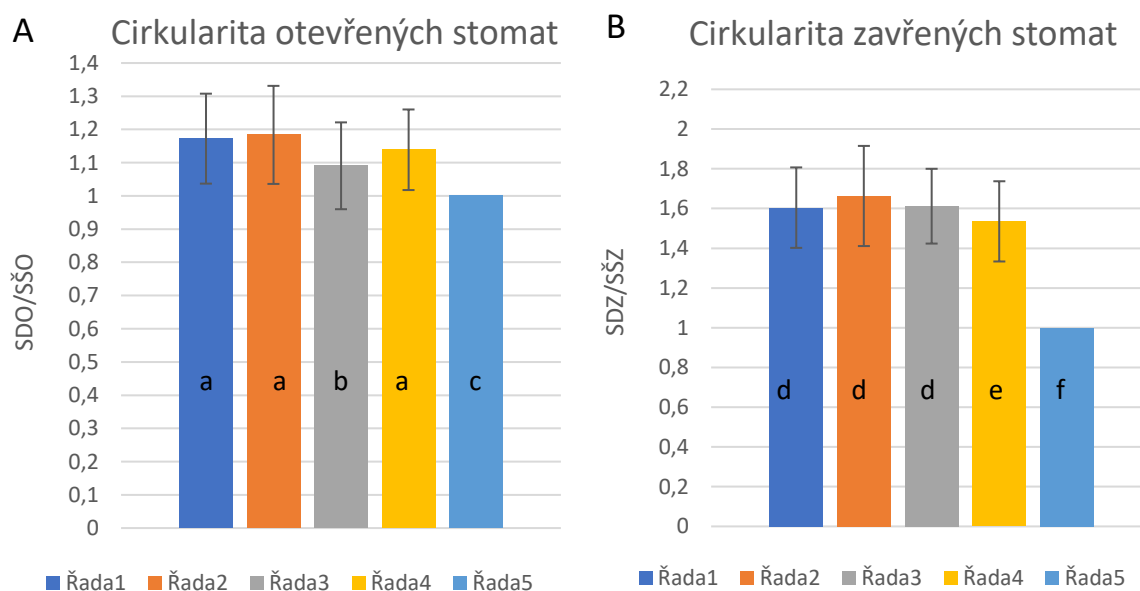
Graf 13 Souhrn velikosti šířky průduchové buňky (B) a výšky pólu (P) v otevřeném (BO, PO) a zavřeném stavu (BZ, PZ). V grafu se vyskytují výsledky dvou na sobě nezávislých statistických testů. Jeden pro (BO+BZ) a druhý pro (PO+PZ). Signifikantně odlišné sledované atributy jsou znázorněny odlišnými písmeny ($p < 0,01$).

Na rozdíl všech ostatních jedinců, má signifikantně nejmenší šířku průduchové buňky *exo70B2* ($p < 0.01$) a to jak v zavřeném (BZ), tak i otevřeném stavu (BO). WT, dvojitý mutant a *exo70B1* se od sebe v otevřeném stavu statisticky i velikostně významně neodlišují. Zajímavým úkazem je minimální změna šířky svěrací buňky při přechodu z otevřeného do zavřeného stavu. Tento rozdíl činí pouze 3 % u *exo70B2* s vysokou hladinou signifikance ($p < 0,01$). U *exo70B1* a dvojitého mutantu jsou to 4 % a rozdíl signifikantně odlišný není. U svěrací buňky WT se nárůst šířky svěrací buňky pohybuje okolo 6 % (Graf 14 A). Jinak je tomu u výšky pólu průduchové buňky (Graf 14A Graf 14B). V tomto případě se signifikantně odlišuje *exo70B1*, u kterého je velikost PO lehce zvýšená, pouze však v otevřeném stavu. Zavření průduchu nemá prakticky žádný vliv na *exo70B1/exo70Ba* *exo70B2*. Naopak u WT i *exo70B1* dochází ke zkrácení výšky pólu v průměru o 13 %.



Graf 14 A) Relativní nárůst šířky zavřené svěrací buňky. B) Relativní pokles výšky pólu zavřené svěrací buňky. A i B bylo zvláště podrobeno statistickému testu ANOVA s post-hoc HSD Tukey testem. Odlišná písmena nazorňují signifikantní rozdíly ($p < 0,01$). * označuje nižší míru signifikance ($p < 0,05$), konkrétně mezi *exo70B2* a dvojitým mutantem.

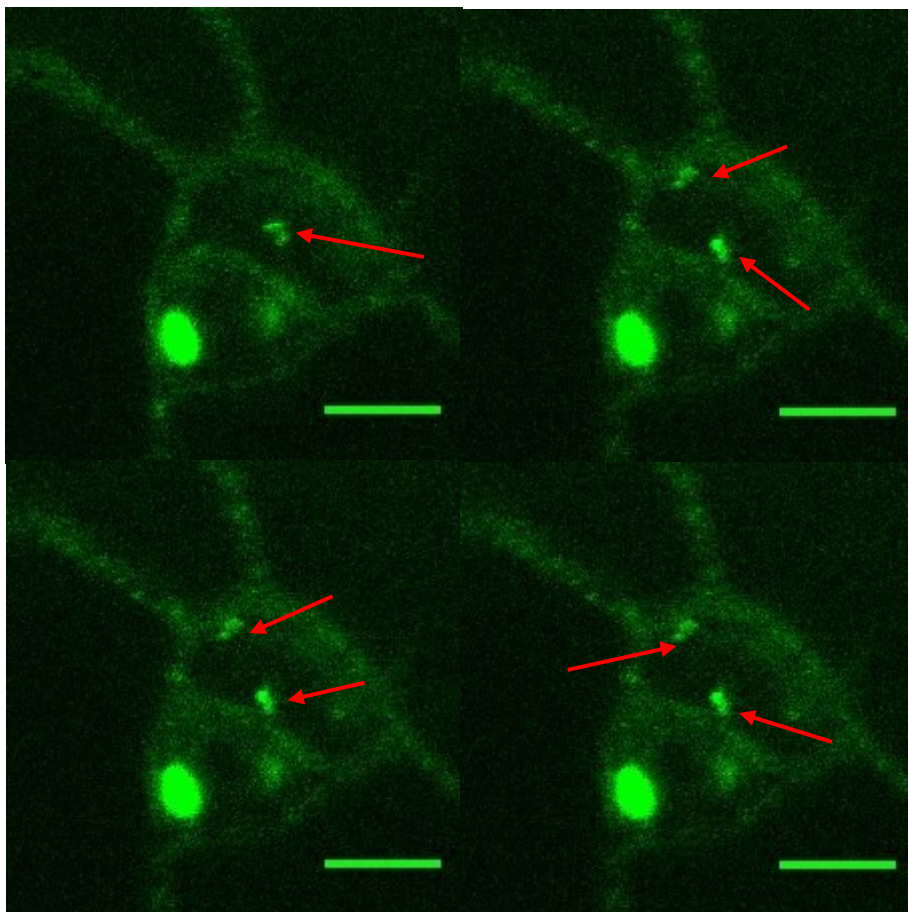
Mutace v podjednotce Exo70B2 má vliv i na celkový tvar průduchů. Poměr délky a šířky celého průduchu částečně vypovídá o jeho tvaru. Čím blíže se tento poměr blíží 1, tím více je finální tvar podoben kruhu. V otevřeném stavu se od ostatních jedinců signifikantně odlišuje *exo70B2*, který se hodnotou poměru délky (SDO) a šířky (SŠO) průduchu, nejvíce přibližuje kruhovému modelu. V zavřeném stavu je modelu naopak nejbližší dvojitý mutant *exo70B1/exo70B2*. Tento výsledek je rovněž signifikantně odlišný od ostatních. Z výsledků tedy lze vyvodit, že mutace *exo70B2* má patrně největší vliv na změny proporcí stomat.



Graf 15 Míra cirkularity otevřených (A) a zavřených stomat (B) je zavedena jako poměr délky celého průduchu (SD) a šířky celého průduchu (SŠ). Otevření či zavření je označeno příponou (O) nebo (Z). Pro graf A i B byl zvláště proveden statistický test ANOVA s post-hoc HSD Tukey testem ($p < 0,01$). Různá písmena označují signifikantně odlišné rozdíly.

8.5 Lokalizace EXO70B1 a EXO70B2 ve stomatech

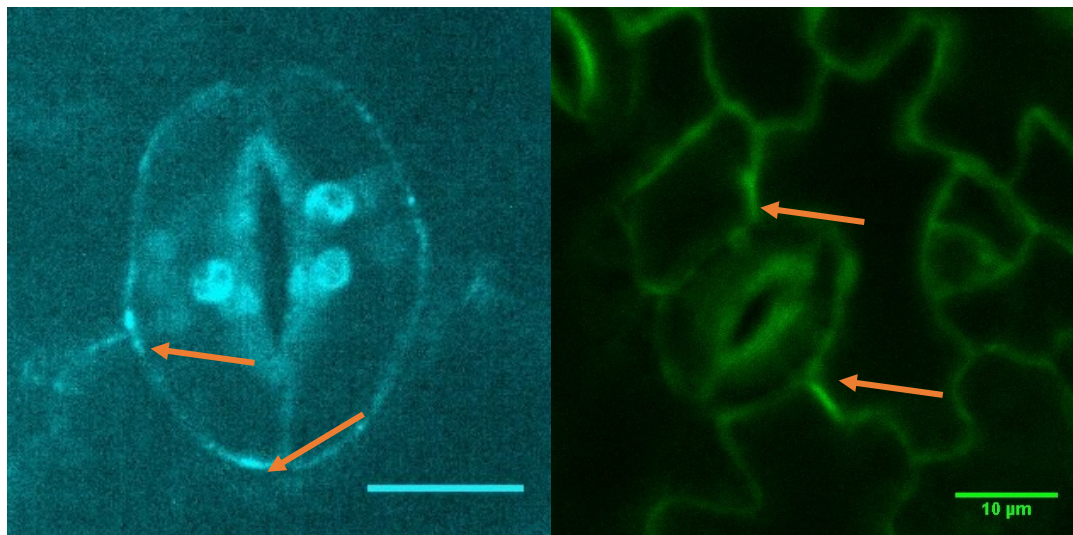
Protein EXO70B1-GFP se bohužel pod přirozeným promotorem nepodařilo nasnímat z důvodu velmi nízké intenzity signálu i u proteinu EXO70B2 byl za ambientních podmínek ve stomatech signál velmi slabý. V meristemoidu už byl signál více zřetelný, ale lokalizaci EXO70B2-GFP na membráně se nepodařilo prokázat. Je však patrná její přítomnost v kompartmentech podobným endosomům.



Obrázek 15 Lokalizace EXO70B2-GFP v meristemoidu časoběrný experiment. Membránový signál je neznatelný. Šípkami je znázorněn signál EXO70B2-GFP pravděpodobně v v zatím neurčeném endomembránovém kompartmentu. Usečka = 5 μ m.

8.6 Lokalizace „core“ podjednotky exocystu SEC8

Podjednotka SEC8-GFP měla opakovatelně pozorovatelný výskyt na rozhraní pomocných buněk stomat a průduchy samotnými. Uvnitř průduchů však signál patrný nebyl.



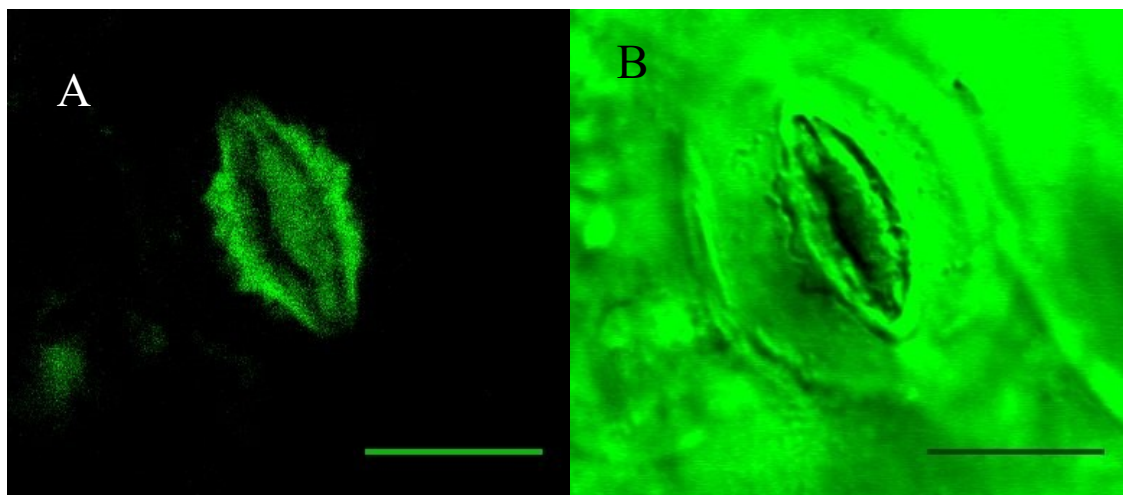
Obrázek 16 Lokalizace SEC8-GFP v dospělých buňkách stomat. Silný signál je patrný na rozhraní pomocné buňky a průduchu, označeno šipkou. Úsečka = 10 μm

9 Diskuze

9.1 Otevřenost stomat

Jedním z cílů této práce bylo objasnit, zda má mutace v genech pro podjednotky exocystu *EXO70B1*, *EXO70B2* a případně jejich kombinace vliv na dynamiku stomat za běžných podmínek. Výsledky některých fytopatologických testů naznačovali, že jedním z faktorů, který by se mohl podílet na fenotypu zvýšené citlivosti k patogenním nákazám u mutanta *exo70B2*, je i pouhá větší otevřenost stomat za běžných podmínek. Provéřit tento stav, se zprvu ukázalo být téměř nepřekonatelnou překážkou. I rostliny pěstované v kultivačních komorách (klíma-boxech) nemají zdaleka plně otevřené průduchy, jelikož zpravidla netrpí nedostatkem CO_2 ani intenzita osvětlení a teplota není vysoká, udržují průduchy v polootevřeném stavu, jež je velice neskonné mikroskopicky změřit a interpretovat. Častým postupem pro kvantifikaci velikosti průduchové apertury, je využití autofluorescence vnitřní stěny svěřacích buněk. Výhodou této metody je vysoké množství

kvantifikovatelných apertur na pořízený snímek. Ovšem v případě, že jsou stomata otevřena pouze částečně, je tento způsob značně zavádějící. V průběhu mnou prováděných experimentů vyšlo najevo, že otevřenost stomatálního póru viditelného pod autofluorescencí, nekoresponduje se snímkem pořízeným běžnou metodou (BF), kde se průduch naopak jeví jako zavřený. Rozměr „autofluorescenční“ apertury kopíruje velikost skutečné průduchové štěrbiny značně nestále a převážně až ve více otevřeném, či úplně zavřeném stavu (Obrázek 17). Razantní změny velikosti průduchové štěrbiny nastávají až při určitém turgorovém tlaku, do té rozměr apertury regulován patrně velice jemně, což naznačují i matematické modely (H. Wu and Sharpe 1979; Woolfenden et al. 2017; Carter et al. 2017). Z tohoto důvodu bylo upuštěno i od metody strhnutí pokožky, která sice poskytuje velice přesně měřitelné průduchy, nicméně jedná se o značně invazivní postup, při kterém dochází ke ztrátě vlivu mezofylových buněk, jež hrají v dynamice stomat také roli (Woolfenden et al. 2017). Stomata byly nakonec měřeny na celých výsečích z listů a následným pořízením velkého množství snímků. Jedinečným přínosem do této problematiky je měření stomatální konduktance, jež poskytuje informace o aktuálním stavu průduchů za různých podmínek.



Obrázek 17 Rozdíl ve velikosti stomatální štěrbiny pod autofluorescencí (A) a BF (B). Úsečka = 10 μm

9.2 Stomatální vodivost

Z analýzy dat pořízených přístrojem Li-Cor Li 6400XT vyšlo najevo, že za ambientních podmínek se vodivost, potažmo tedy i velikost štěrbin, neodlišuje od WT. Bohužel během tohoto experimentu došlo k nečekanému poklesu konduktance v druhém a třetím měření (2. WT vs *exo70B2* a 3. WT vs *exo70B1/exo70B2*). A bylo tedy nemožné, mezi sebou statisticky porovnat hodnoty mutantů. Nicméně organizace experimentu byla přednostně navržena k zjištění rozdílu v chování mutací a WT, který touto změnou našťestí nebyl narušen. Pokles v hodnotách konduktance, přisuzují délce pobytu testovaných rostlin v jiné kultivační komoře, kde nebylo možné zajistit totožné podmínky s komorou původní. Pro měření však bylo nutné, vypěstovat rostliny do značné velikosti, aby mohly být listy řádně změřeny a nedocházelo k přílišným deformacím. Z tohoto důvodu bylo v experimentu použito poměrně starých rostlin 7-8 týdnů. To je však velice blízko stáří, kdy se začíná intenzivně projevovat mutace *exo70B1*, ačkoliv nikdy nebylo v tomto experimentu pracováno s listy, jež by vykazovali tvorbu HR lézí, může být jeho výsledek tímto faktorem značně ovlivněn. Velmi vysoké změny v intenzitě osvětlení bylo užito z důvodu indukování silné stresové reakce, jež by mohla odhalit projev sledovaných mutací.

Měně intenzivní nárůst konduktance u mutace *exo70B1*, v důsledku změny intenzity osvětlení, je v souladu s publikovanými pracemi (Hong et al., 2016), kde je tento jev studován přímo na rozměrech stomat ve spojitosti s aktivitou ROP2/RIC7, který se podílí na regulaci otevírání stomat působením světla. Zásadním objevem je však snížená reaktivita mutantu *exo70B2*, jež v tomto kontextu nebyla nikdy publikována. Relativní nárůst vodivosti v prvním případě (u WT vs *exo70B1*), je oproti WT téměř o polovinu menší, než je tomu v případě WT vs *exo70B2*. Zdá se tedy, že efekt první mutace má masivnější dopad na dynamiku průduchů. Měření kombinace obou těchto mutací ovšem dokazuje, že projev *exo70B1* a *exo70B2* není synergický, naopak se zdá být silnější fenotyp *exo70B1* potlačen vlivem mutace *exo70B2*. O původu tohoto fenoménu, lze pouze spekulovat, jelikož vliv dvojité mutace *exo70B1/exo70B2* na stomata nebyl doposud studován. Kontrola hustoty průduchů neodhalila žádný signifikantní rozdíl mezi mutanty a WT. A tudíž je fenotyp všech mutantů pravděpodobně způsoben odlišnou dynamikou stomat. Mechanismus, jakým jsou tyto podjednotky přesně zapojeny do regulace průduchů, zůstává prozatím neobjasněn. Důležitým faktorem, majícím vliv na otevřenost stomat, je dynamika plazmatické membrány a vakuoly, během pohybů stomat se tvoří množství váčků a tubulů, jejichž zpětná integrace

je nutná pro správnou funkci průduchů (Tobias Meckel et al. 2004; T. Meckel et al. 2005; X.-Q. Gao et al. 2005). A jak podjednotka exocystu EXO70B1, tak EXO70B2 jsou důležitými proteiny váčkového transportu (V Žárský et al. 2009; Pečenková et al. 2011; Viktor Žárský et al. 2013; Kulich et al. 2013). Exocytózou rovněž dochází k intenzivní retranslokaci draselných kanálů KAT1, které jsou jedním z hlavních faktorů podílejících se na změnách turgoru (Hurst et al. 2004; T. Meckel et al. 2005; Tobias Meckel et al. 2007).

Razantní nárůst v konduktanci, jenž nastává během prvních 20 vteřin od zvýšení intenzity osvětlení, má velmi specifický průběh, který zřejmě vzniká kombinací mnoha faktorů. Nejrychleji pravděpodobně reaguje fotosyntéza, to podporuje i fakt, že pokles konduktance v důsledku vypnutí osvětlení má v prvních 20 vteřinách velmi podobný průběh i velikost. Nicméně i tento rapidní nárůst je u mutantů oproti WT nižší, což by mohlo být způsobeno nejen přímo aktivní odpovědí na vysokou intenzitu světla, ale i dynamickými možnostmi stomat mutantních jedinců v případě, že by byl vývoj průduchů nějakým způsobem pozměněn. Proto bylo provedeno rozsáhlé měření různých atributů stomat v reakci na odlišné světelné podmínky.

Nicméně tyto experimenty nevypovídají o tom, zda je nárůst v konduktanci stomat u mutantů pouze zpomalen, či omezen. Organizace experimentu byla naplánována k pořízení co nejvíce opakovaní měření od jednotlivých sledovaných linií, jelikož je variabilita konduktance mezi jednotlivými listy poměrně vysoká. Rovněž i převoz a přenos rostlin z místa na místo není ideální a bylo by vhodnější měřit přímo v kultivační místnosti. Dalším faktorem, s kterým se muselo během měření počítat, byla délka dne použitá pro kultivaci rostlin. Aby totiž bylo dosaženo dostatečně velké listové růžice a inhibován nástup kvetení, probíhala kultivace rostlin na krátkém dni. Navíc zde byl problém s nástupem fenotypu *exo70B1*, kdy se při tomto stáří 7-8 mohou objevit HR léze v krátkém časovém horizontu. Z toho důvodu převážně krátkého dne, musel být interval měření nastaven pouze na 20 minut na jedince, aby bylo dosaženo dostatečného množství měření, což je vzhledem k jiným publikovaným textům velmi málo. Experiment byl v průběhu výzkumu proveden 2x a 3x v případě WT vs *exo70B2*. Během 1. měření však v průběhu došlo zřejmě ke špatné kalibraci přístroje před začátkem měření, což mělo za následek znehodnocení mnoha 80 % dat, ovšem křivka nárůstu konduktance má ve zbylých 20 % stejný průběh s posledním měřením. Sólóvý experiment v případě WT vs *exo70B2* poskytuje totožné výsledky jako poslední, v této práci uvedené měření.

9.3 Hustota průduchů a vysoušecí experiment

Experiment provedený za účelem odhalit změny v hustotě průduchů, nepřinesl žádné statisticky signifikantní výsledky a je tedy možné považovat vliv mutací v genech *EXO70B1* i *EXO70B2* za nulový.

Vysoušecí experiment ukázal, že se samostatní mutanti neodlišují od WT, dvojitý mutant v 3 na sobě nezávislých měřeních (data nejsou prezentována) pokaždé vykazuje náhlý pokles hmotnosti. Tento fenomén se však liší v čase, kdy k němu dochází. Předchozí měření bylo navíc provedeno na odlišně starých rostlinách. U tohoto typu testu je problematické docílit statisticky signifikantních hodnot, jelikož je velmi obtížné dodržet přesné podmínky při vážení, výběru listů a manipulaci s testovanými listy, což reprodukování. Není proto možné s jistotou říci, zda přítomnost obou mutací v genech *EXO70B1* a *EXO70B2* má v tomto případě vliv na ztrátu hmotnosti.

9.4 Změny v proporcích průduchů *exo70B2*

V tomto experimentu bohužel nebylo možné použít stejně starých rostlin, jako tomu bylo při měření konduktance. U 7-8 týdnů starých rostlin se nedařilo otevřít průduchy v SOB pufru. Proto byly v tomto experimentu testovány rostliny staré 5 týdnů, kde již otevření průduchů nebylo překážkou. Z výsledků vyplynulo, že mutace v podjednotce exocystu *EXO70B2* má pravděpodobně vliv na velikost průduchu i apertury. Tento defekt ovšem nemusí hrát roli za ambientních podmínek, kdy nejsou průduchy otevřeny plně, což koresponduje i s měřením konduktance. Změny v jednotlivých sledovaných attributech rovněž naznačují, že způsob otvírání a zavírání průduchů by mohl být lehce odlišný. Zatímco u WT i *exo70B1* se výška pólu svěřací buňky v průběhu zavírání prodlužuje, pro *exo70B2* i dvojitého mutantu zůstává téměř stejná. U průduchů *exo70B2* dochází během otvírání či zavírání patrně k odlišným změnám poměru délky a šířky, což má za následek vyšší cirkularitu otevřeného i zavřeného stoma.

Příčinou narušení dynamiky stomat u této mutace, by mohla být pozměněná tvorba buněčné stěny kolem průduchové štěrbin. Podjednotka *EXO70B2* se účastní tvorby papil při obraně před patogeny, průvodním jevem tohoto procesu je i ukládání kalózy, která je důležitou složkou při tvorbě buněčné stěny (Pečenková et al., 2011; Stegmann et al., 2012;

Ortmannová et al., v přípravě). Na formaci průduchů má zásadní vliv EXO84b, kde je jejich vývoj fatálně narušen (Fendrych et al. 2010). Změny v proporcích ukazují, že fluktuace délky stomat je při pohybech u *exo70B2* větší než u ostatních mutantů a WT. Tím vyvstává otázka, zda není vývoj průduchů u *exo70B2* pouze zpomalen, jelikož tímto způsobem se pohybují mladé průduchy, jež doposud nemají náležitě vyvinuty všechny potřebné komponenty, případně nedochází-li k špatně tvorbě celulóзовých vláken (Carter et al. 2017). V této studii je navíc ukázáno, že složení BS se na pólech mění ve výskytu methylovaných a de-esterifikovaných pektinů, což má za následek tuhnutí pólů stomat a efektivnější otevření stomat. Podjednotka exocystu EXO70A1 je spojována s ukládáním pektinů do vulkanických buněk semen (Kulich et al. 2010). Tento proces je spojen rovněž s podjednotkou SEC8, která lokalizuje na okolo průduchů, není tedy vyloučeno, že by se Exo70B2 mohla účastnit depozice pektinů do svěřacích buněk.

I přes poměrně velké množství analyzovaných průduchů (pro 250 na mutantní linii), je interpretace takto získaných dat v některých případech dle mého názoru zavádějící. Zásadním problémem zůstává měření apertury v zavřeném stavu, kde se rozptyl dat, vlivem lidského faktoru, podstatně zvyšuje. A proto výsledky vypovídající velikosti zavřené apertury a jemných proporcí změn tvaru svěřací buňky, mohou být falešně pozitivní. Planární pozorování stomat navíc postrádá 3. rozměr a není jisté, zda velikost apertury, tak jak ji vidíme, odpovídá skutečnosti a průduch není například více vyklenut v ose z.

9.5 Projev mutace *exo70B1* na *stomata*

Mutace homologního genu EXO70B1 se v proporcích stomat nijak výrazně neodlišuje od WT a zdá se tedy, že změna konduktance, naměřená přístrojem Li-Cor Li 6400XT, je způsobena pouze sníženou senzitivitou mutovaného jedince k otevírání stomat na světle, prostřednictvím interakce s ROP2/RIC7 (Hong et al. 2016; Seo et al. 2016). Vlivů však může být mnohem více. I zde by mohlo dojít k narušení dynamiky membrán vlivem autofagie a re-translokace kanálů pro draslík KAT1 (Hurst et al. 2004; Tobias Meckel et al. 2007; Kulich et al. 2013).

9.6 Fenotypové projevy dvojité mutace *exo70B1/exo70B2*

V průběhu bezpočtu opakovaných kultivací sledovaných mutantních linií, bylo zjištěno, že u dvojitého mutantu *exo70B1/exo70B2* je nástup tvorby HR lézí (fenotyp *exo70B1*) oproti samostatné mutaci opožděn a zpočátku je i méně intenzivní. Přítomnost

exo70B2 tedy částečně potlačuje fenotyp mutace *exo70B1*. Z výsledků provedených experimentů je možno usoudit, že se tento efekt netýká pouze tvorby HR lézí, ale i vlivu na dynamiku stomat. V případě měření konduktance je projev dvojité mutace nejvíce podobný WT, což ovšem může být projev výše zmiňovaným delším pobytem v kultivační komoře. Relativně je rozdíl v konduktanci vůči WT srovnatelný s projevem *exo70B2*.

Jedním z důvodů, proč by mohla kombinace obou mutací potlačovat projev jednotlivých, je akumulace kyseliny salicylové (SA) (i jiných fytohormonů) v *exo70B1* a narušení obranyschopnosti u mutace *exo70B2* (Pečenková et al. 2011; Kulich et al. 2013). Vzhledem k značnému stáří testovaných rostlin, je více než pravděpodobné, že koncentrace SA v průběhu měření byla v listech *exo70B1* zvýšená. To mohlo, společně s efektem spojeným s ROP2/RIC7, přispět k výraznějšímu prohloubení rozdílu mezi mutacemi *exo70B1* a *exo70B2*. Naproti tomu mutant *exo70B2* vykazuje sníženou schopnost obrany před patogeny, která velice úzce souvisí s právě s kyselinou salicylovou, ačkoliv efekt mutace *exo70B2* je spojen spíše s rozeznáním přítomnosti patogenu (Pečenková et al. 2011; Stegmann et al. 2012), není možné vyloučit překryv projevů obou těchto mutací a jejich drah. To podporuje i fakt, že dvojitý mutant částečně potlačuje a zpomaluje tvorbu hypersenzitivních lézí. Výsledky z měření proporcí stomat rovněž ukazují na větší podobnost spíše s projevem mutace *exo70B2*, nicméně oproti ostatním sledovaným liniím, u dvojitého mutantu se průduch, vlivem pobytu ve tmě, zavírá 10 % méně (tento rozdíl ovšem není statisticky signifikantní) a zůstává více otevřen, než je tomu u ostatních, což paradoxně odpovídá i rozdílu úbytku hmotnosti ve vysoušecím experimentu, který se od ostatních liší rovněž o 10 %. Příčinou této odlišnosti, by mohlo být odštížení listu a aktivace poplašných reakcí, které jsou poškozením v buňkách indukovány. Zejména pak autofagie, která obecně ve větší či menší míře doprovází buněčnou smrt. Jelikož je u obou mutací prokázáno zapojení do autofagických dějů (Kulich et al. 2013; Teh et al. 2018), může dojít naopak k sečtení efektu mutovaných genů. To by mohlo mít za následek pozměnění dynamických změn vakuoly a plasmatické membrány, jež jsou důležitou součástí pohybů průduchů (Hurst et al., 2004; Tobias Meckel et al., 2004; X. Q. Gao et al., 2009). Čímž by se dala vysvětlit nižší otevřenost průduchů.

9.7 Lokalizace podjednotek exocystu

Pro tuto práci vytvořený konstrukt EXO70B1-GFP s přirozeným promotorem byl z neznámého důvodu nefunkční. Na vině by mohla být například ubiquitinace či RNA

interference, která by ovlivnila činnost tohoto proteinu. Degradace tohoto proteinu PUB18 E3 ubiquitin ligázou v závislosti na ABA a stresu způsobeného mannitolem byla popsána v (Seo et al. 2016). Nicméně přítomnost EXO70B1 není pozorovatelná ani za ambientních podmínek, a tedy mechanismus její případné degradace bude vázán na jinou dráhu, která doposud nebyla objevena.

Konstrukt EXO70B2-GFP pod přirozeným promotorem nemá za ambientních podmínek silný signál a v dospělých buňkách stomat je nepozorovatelný. Během vývoje průduchu je však možné EXOB2 detekovat v kompartmentech podobným endosomům.

Konstrukt SEC8-GFP se ukázal být konstantě aktivní kolem průduchových buněk a na rozhraních mezi pomocnými buňkami. Avšak jeho úloha ve stomatech zůstává neobjasněna a je nutno tento fenomén lépe prostudovat.

10 Souhrn

1. Podařilo se prokázat vliv mutací v genech EXO70B1, EXO70B2 a EXO70B1+EXO70B2 na otevírání průduchů na světle.
2. Podařilo se prokázat vliv mutace v genu *EXO70B2* na tvar a otevřených velikost stomat. Mutant *exo70B1* nevykazuje zásadní odlišnost ve velikosti průduchů.
3. Nepodařilo se lokalizovat EXO70B1-GFP v průduších ani jiných částech rostliny, nepodařilo se lokalizovat EXO70B2-GFP na membráně průduchů, pouze jako součást endomembránových kompartmentů, které bude nutné blíže určit.

11 Seznam citované literatury

- Amsbury, Sam, Lee Hunt, Nagat Elhaddad, Alice Baillie, Marjorie Lundgren, Yves Verhertbruggen, Henrik V. Scheller, J. Paul Knox, Andrew J. Fleming, and Julie E. Gray. 2016. "Stomatal Function Requires Pectin De-Methyl-Esterification of the Guard Cell Wall." *Current Biology* 26 (21): 2899–2906. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.021>.
- Andrews, Hillary K., Yong Q. Zhang, Nick Trotta, and Kendal Broadie. 2002. "Drosophila Sec10 Is Required for Hormone Secretion but Not General Exocytosis or Neurotransmission." *Traffic* 3 (12): 906–21. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31206.x>.
- Assmann, Sarah M, Zhongyao Sun, Xiaofen Jin, Réka Albert, Sarah M Assmann, Zhongyao Sun, and Xiaofen Jin. 2014. "Multi-Level Modeling of Light-Induced Stomatal Opening Offers New Insights into Its Regulation by Drought." *PLOS Computational Biology* 10 (11): e1003930. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003930>.
- Bak, G., E.-J. Lee, Y. Lee, M. Kato, S. Segami, H. Sze, M. Maeshima, J.-U. Hwang, and Y. Lee. 2013. "Rapid Structural Changes and Acidification of Guard Cell Vacuoles during Stomatal Closure Require Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate." *The Plant Cell* 25 (6): 2202–16. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110411>.
- Barragan, V., E. O. Leidi, Z. Andres, L. Rubio, A. De Luca, J. A. Fernandez, B. Cubero, and J. M. Pardo. 2012. "Ion Exchangers NHX1 and NHX2 Mediate Active Potassium Uptake into Vacuoles to Regulate Cell Turgor and Stomatal Function in Arabidopsis." *The Plant Cell* 24 (3): 1127–42. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095273>.
- Bergmann, Dominique C., Wolfgang Lukowitz, and Chris R. Somerville. 2004. "Stomatal Development and Pattern Controlled by a MAPKK Kinase." *Science* 304 (5676): 1494–97. <https://doi.org/10.1126/science.1096014>.
- Bergmann, Dominique C., and Fred D. Sack. 2007. "Stomatal Development." *Annual Review of Plant Biology* 58 (1): 163–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.104023>.
- Blatt, Michael R. 2000. "Cellular Signaling and Volume Control in Stomatal Movements in Plants." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16 (1): 221–41.

<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.221>.

- Blatt, Michael R, David W A Hamilton, Adrian Hills, Barbara Ko, Barbara Köhler, and Michael R Blatt. 2000. "Ca²⁺ Channels at the Plasma Membrane of Stomatal Guard Cells Are Activated by Hyperpolarization and Abscisic Acid." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (9): 4967–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.080068897>.
- Bloch, Daria, Roman Pleskot, Přemysl Pejchar, Martin Potocký, Pavlína Trpkošová, Lukasz Cwiklik, Nemanja Vukašinić, Hasana Sternberg, Shaul Yalovsky, and Viktor Žárský. 2016. "Exocyst SEC3 and Phosphoinositides Define Sites of Exocytosis in Pollen Tube Initiation and Growth." *Plant Physiology*, pp.00690.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00690>.
- Boyd, Charles, Thom Hughes, Marc Pypaert, and Peter Novick. 2004. "Vesicles Carry Most Exocyst Subunits to Exocytic Sites Marked by the Remaining Two Subunits, Sec3p and Exo70p." *Journal of Cell Biology* 167 (5): 889–901. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408124>.
- Brandt, Benjamin, Shintaro Munemasa, Cun Wang, Desiree Nguyen, Taiming Yong, Paul G Yang, Elly Poretsky, et al. 2015. "Calcium Specificity Signaling Mechanisms in Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis Guard Cells." *Elife* 4: e03599. <https://doi.org/10.7554/eLife.03599>.
- Caine, Robert S., Caspar C. Chater, Yasuko Kamisugi, Andrew C. Cuming, David J. Beerling, Julie E. Gray, and Andrew J. Fleming. 2016. "An Ancestral Stomatal Patterning Module Revealed in the Non-Vascular Land Plant *Physcomitrella Patens*." *Development* 143 (18): 3306–14. <https://doi.org/10.1242/dev.135038>.
- Carter, Ross, Hugh Woolfenden, Alice Baillie, Sam Amsbury, Sarah Carroll, Eleanor Healicon, Spyros Sovatzoglou, et al. 2017. "Stomatal Opening Involves Polar, Not Radial, Stiffening Of Guard Cells." *Current Biology* 27 (19): 2974–2983.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.006>.
- Chater, Caspar C C, James Oliver, Stuart Casson, and Julie E Gray. 2014. "Putting the Brakes on: Abscisic Acid as a Central Environmental Regulator of Stomatal Development." *New Phytologist* 202 (2): 376–91. <https://doi.org/10.1111/nph.12713>.

- Clough, Steven J., and Andrew F. Bent. 1998. "Floral Dip: A Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of *Arabidopsis Thaliana*." *Plant Journal* 16 (6): 735–43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>.
- Cvrčková, Fatima, Michal Grunt, Radek Bezvoda, Michal Hála, Ivan Kulich, Anamika Rawat, and Viktor Žárský. 2012. "Evolution of the Land Plant Exocyst Complexes." *Frontiers in Plant Science* 3 (July): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00159>.
- Davies, Peter J. 2010. *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions BT - Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Edited by Peter J Davies. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1.
- Diekmann, Wilfried, Rainer Hedrich, Klaus Raschke, and David G. Robinson. 1993. "Osmocytosis and Vacuolar Fragmentation in Guard Cell Protoplasts: Their Relevance to Osmotically-Induced Volume Changes in Guard Cells." *Journal of Experimental Botany* 44 (10): 1569–77. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.10.1569>.
- Drdová, Edita Janková, Lukáš Synek, Tamara Pečenková, Michal Hála, Ivan Kulich, John E. Fowler, Angus S. Murphy, and Viktor Žárský. 2013. "The Exocyst Complex Contributes to PIN Auxin Efflux Carrier Recycling and Polar Auxin Transport in *Arabidopsis*." *Plant Journal* 73 (5): 709–19. <https://doi.org/10.1111/tpj.12074>.
- Dubuke, Michelle L., Stephanie Maniatis, Scott A. Shaffer, and Mary Munson. 2015. "The Exocyst Subunit Sec6 Interacts with Assembled Exocytic SNARE Complexes." *Journal of Biological Chemistry* 290 (47): 28245–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.673806>.
- Duplan, Vincent, and Susana Rivas. 2014. "E3 Ubiquitin-Ligases and Their Target Proteins during the Regulation of Plant Innate Immunity." *Frontiers in Plant Science* 5 (February): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00042>.
- Eisinger, William, David Ehrhardt, and Winslow Briggs. 2012. "Microtubules Are Essential for Guard-Cell Function in *Vicia* and *Arabidopsis*." *Molecular Plant* 5 (3): 601–10. <https://doi.org/10.1093/mp/sss002>.
- Elias, M., E. Drdova, D. Ziak, B. Bavlínka, M. Hála, F. Cvrckova, H. Soukupova, and V. Zarsky. 2003. "The Exocyst Complex in Plants." *Cell Biology International* 27 (3): 199–201. [https://doi.org/10.1016/S1065-6995\(02\)00349-9](https://doi.org/10.1016/S1065-6995(02)00349-9).

- Eun, Soon Ok, and Youngsook Lee. 2000. "Stomatal Opening by Fusicoccin Is Accompanied by Depolymerization of Actin Filaments in Guard Cells." *Planta* 210 (6): 1014–17. <https://doi.org/10.1007/s004250050711>.
- Fendrych, Matyáš, Lukáš Synek, Tamara Pečenková, Hana Toupalová, Rex Cole, Edita Drdová, Jana Nebesářová, et al. 2010. "The *Arabidopsis* Exocyst Complex Is Involved in Cytokinesis and Cell Plate Maturation." *The Plant Cell* 22 (9): 3053–65. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074351>.
- Fischer, R.A. 1968. "Stomatal Opening: Role of Potassium Uptake by Guard Cells." *Science* 160: 784–85. <https://doi.org/10.1126/science.160.3829.784>.
- Franks, P. J., I. R. Cowan, and G. D. Farquhar. 1998. "A Study of Stomatal Mechanics Using the Cell Pressure Probe." *Plant, Cell and Environment* 21 (1): 94–100. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00248.x>.
- Franks, P. J., and G. D. Farquhar. 2006. "The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control." *Plant Physiology* 143 (1): 78–87. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089367>.
- Franks, Peter J, Thomas N Buckley, Joseph C Shope, and Keith A Mott. 2001. "Guard Cell Volume and Pressure Measured Concurrently by Confocal Microscopy and the Cell Pressure Probe." *Plant Physiol.* 125 (4): 1577–84. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1577>.
- Frayse, Laure C, Brian Wells, Maureen C Mccann, and Per Kjellbom. 2005. "Specific Plasma Membrane Aquaporins of the PIP1 Subfamily Are Expressed in Sieve Elements and Guard Cells." *Biology of the Cell* 97 (7): 519–34. <https://doi.org/10.1042/BC20040122>.
- Fukuda, Megumi, Seiichiro Hasezawa, Naoko Asai, Nobuyoshi Nakajima, and Noriaki Kondo. 1998. "Dynamic Organization of Microtubules in Guard Cells of *Vicia faba* L. with Diurnal Cycle." *Plant Cell Physiol.* 39 (1): 80–86. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029293>.
- Gao, Xin-Qi, Chun-Guang Li, Peng-Cheng Wei, Xin-Yan Zhang, Jia Chen, and Xue-Chen Wang. 2005. "The Dynamic Changes of Tonoplasts in Guard Cells Are Important for Stomatal Movement in *Vicia faba*." *Plant Physiology* 139 (3): 1207–16. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067520>.

- Gao, Xin Qi, Xiu Ling Wang, Fei Ren, Jia Chen, and Xue Chen Wang. 2009. “Dynamics of Vacuoles and Actin Filaments in Guard Cells and Their Roles in Stomatal Movement.” *Plant, Cell and Environment* 32 (8): 1108–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01993.x>.
- Geiger, Dietmar, Tobias Maierhofer, Khaled A S AL-Rasheid, Sönke Scherzer, Patrick Mumm, Anja Liese, Peter Ache, et al. 2011. “Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1.” *Sci. Signal.* 4 (173): ra32-ra32. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001346>.
- GLINKA, Z. 1971. “The Effect of Epidermal Cell Water Potential on Stomatal Response to Illumination of Leaf Discs of *Vicia Faba*.” *Physiologia Plantarum* 24 (3): 476–79. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1971.tb03521.x>.
- Gobert, Anthony, Stanislav Isayenkov, Camilla Voelker, Katrin Czempinski, and Frans J M J. M. Maathuis. 2007. “The Two-Pore Channel TPK1 Gene Encodes the Vacuolar K⁺ Conductance and Plays a Role in K⁺ Homeostasis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (25): 10726–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702595104>.
- Gosti, Françoise, Nathalie Beaudoin, Carine Serizet, Alex A R Webb, Nicole Vartanian, and Jérôme Giraudat. 1999. “ABI1 Protein Phosphatase 2C Is a Negative Regulator of Abscisic Acid Signaling.” *The Plant Cell* 11 (10): 1897–1909. <https://doi.org/https://doi.org/10.1105/tpc.11.10.1897>.
- Gowing, D J G, H G Jones, and W J Davies. 1993. “Xylem-Transported Abscisic Acid: The Relative Importance of Its Mass and Its Concentration in the Control of Stomatal Aperture.” *Plant, Cell & Environment* 16 (4): 453–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00892.x>.
- Grondin, Alexandre, Olivier Rodrigues, Lionel Verdoucq, Sylvain Merlot, Nathalie Leonhardt, and Christophe Maurel. 2015. “Aquaporins Contribute to ABA-Triggered Stomatal Closure through OST1-Mediated Phosphorylation.” *The Plant Cell* 27 (7): 1945–54. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00421>.
- Grote, Eric, Chavela M. Carr, and Peter J. Novick. 2000. “Ordering the Final Events in Yeast Exocytosis.” *Journal of Cell Biology* 151 (2): 439–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.439>.
- Guo, Wei, Althea Grant, and Peter Novick. 1999. “Exo84p Is an Exocyst Protein Essential

- for Secretion.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (33): 23558–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23558>.
- Guo, Wei, Dagmar Roth, Christiane Walch-Solimena, and Peter Novick. 1999. “The Exocyst Is an Effector for Sec4P, Targeting Secretory Vesicles to Sites of Exocytosis.” *EMBO Journal* 18 (4): 1071–80. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.1071>.
- Guo, Wei, Fuyuhiko Tamanoi, and Peter Novick. 2001. “Spatial Regulation of the Exocyst Complex by Rho1 GTPase.” *Nature Cell Biology* 3 (4): 353. <https://doi.org/10.1038/35070029>.
- Hala, M., R. Cole, L. Synek, E. Drdova, T. Pecenkova, A. Nordheim, T. Lamkemeyer, et al. 2008. “An Exocyst Complex Functions in Plant Cell Growth in Arabidopsis and Tobacco.” *The Plant Cell Online* 20 (5): 1330–45. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059105>.
- He, Bing, Fengong Xi, Xiaoyu Zhang, Jian Zhang, and Wei Guo. 2007. “Exo70 Interacts with Phospholipids and Mediates the Targeting of the Exocyst to the Plasma Membrane.” *EMBO Journal* 26 (18): 4053–65. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601834>.
- Hong, Daewoong, Byeong Wook Jeon, Soo Young Kim, Jae Ung Hwang, and Youngsook Lee. 2016. “The ROP2-RIC7 Pathway Negatively Regulates Light-Induced Stomatal Opening by Inhibiting Exocyst Subunit Exo70B1 in Arabidopsis.” *New Phytologist* 209 (2): 624–35. <https://doi.org/10.1111/nph.13625>.
- Hossain, M. A., S. Munemasa, M. Uraji, Y. Nakamura, I. C. Mori, and Y. Murata. 2011. “Involvement of Endogenous Abscisic Acid in Methyl Jasmonate-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 156 (1): 430–38. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172254>.
- Hosy, E., A. Vavasseur, K. Mouline, I. Dreyer, F. Gaymard, F. Poree, J. Boucherez, et al. 2003. “The Arabidopsis Outward K⁺ Channel GORK Is Involved in Regulation of Stomatal Movements and Plant Transpiration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (9): 5549–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0733970100>.
- Hsu, Shu-chan, Christopher D Hazuka, Robyn Roth, Davide L Foletti, John Heuser, and Richard H Scheller. 1998. “Subunit Composition, Protein Interactions, and Structures of the Mammalian Brain Sec6 / 8 Complex and Septin Filaments.” *Cell* 20: 1111–22.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80493-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80493-6).

- Hsu, Shu Chan, Anthony E. Ting, Christopher D. Hazuka, Svend Davanger, James W. Kenny, Yun Kee, and Richard H. Scheller. 1996. "The Mammalian Brain Rsec6/8 Complex." *Neuron* 17 (6): 1209–19. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80251-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80251-2).
- Hu, Honghong, Aurélien Boisson-dernier, Maria Israelsson-Nordström, Maik Böhmer, Shaowu Xue, Amber Ries, Jan Godoski, Josef M Kuhn, and Julian I Schroeder. 2009. "Carbonic Anhydrases Are Upstream Regulators of CO₂-Controlled Stomatal Movements in Guard Cells." *Nature Cell Biology* 12 (1): 87. <https://doi.org/10.1038/ncb2009>.
- Hurst, Annette C., Tobias Meckel, Sascha Tayefeh, Gerhard Thiel, and Ulrike Homann. 2004. "Trafficking of the Plant Potassium Inward Rectifier KAT1 in Guard Cell Protoplasts of *Vicia Faba*." *Plant Journal* 37 (3): 391–97. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01972.x>.
- Inoue, Shin-ichiro, and Toshinori Kinoshita. 2017. "Blue Light Regulation of Stomatal Opening and the Plasma Membrane H⁺-ATPase." *Plant Physiology* 174 (2): 531–38. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00166>.
- Jeon, B. W., J.-U. Hwang, Y. Hwang, W.-Y. Song, Y. Fu, Y. Gu, F. Bao, et al. 2008. "The Arabidopsis Small G Protein ROP2 Is Activated by Light in Guard Cells and Inhibits Light-Induced Stomatal Opening." *The Plant Cell Online* 20 (1): 75–87. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054544>.
- Jezek, Mareike, and Michael R Blatt. 2017. "The Membrane Transport System of the Guard Cell and Its Integration for Stomatal Dynamics." *Plant Physiology* 174 (2): 487 LP-519. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01949>.
- Jiang, Kun, Karim Sorefan, Michael J Deeks, Michael W Bevan, Patrick J Hussey, and Alistair M Hetherington. 2012. "The ARP2/3 Complex Mediates Guard Cell Actin Reorganization and Stomatal Movement in Arabidopsis." *The Plant Cell*, tpc-112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1105/tpc.112.096263>.
- Jiang, Yan, Kai Wu, Feng Lin, Yana Qu, Xiaoxiang Liu, and Qun Zhang. 2014. "Phosphatidic Acid Integrates Calcium Signaling and Microtubule Dynamics into Regulating ABA-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis." *Planta* 239 (3): 565–75. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1999-5>.

- Jing, Xin-qi Gao, Chen Peng-cheng Wei, Fei Ren, Jia Chen, Xin-Qi Gao, Jia Jing Chen, Peng-Cheng Wei, et al. 2008. "Array and Distribution of Actin Filaments in Guard Cells Contribute to the Determination of Stomatal Aperture." *Plant Cell Reports* 27 (10): 1655–65. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0581-2>.
- Jones, L., J. L. Milne, D. Ashford, and S. J. McQueen-Mason. 2003. "Cell Wall Arabinan Is Essential for Guard Cell Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (20): 11783–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832434100>.
- Khokon, MD Atiqur Rahman, Eiji Okuma, Mohammad Anowar Hossain, Shintaro Munemasa, Misugi Uraji, Yoshimasa Nakamura, Izumi C. Mori, and Yoshiyuki Murata. 2011. "Involvement of Extracellular Oxidative Burst in Salicylic Acid-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis." *Plant, Cell and Environment* 34 (3): 434–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02253.x>.
- Kim, Tae-Wuk, Marta Michniewicz, Dominique C Bergmann, and Zhi-Yong Wang. 2012. "Brassinosteroid Regulates Stomatal Development by GSK3-Mediated Inhibition of a MAPK Pathway." *Nature* 482 (7385): 419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature10794.Brassinosteroid>.
- Kinoshita, Toshinori, Michio Doi, Noriyuki Suetsugu, Takatoshi Kagawa, Masamitsu Wada, and Ken-ichiro Shimazaki. 2001. "Phot1 and Phot2 Mediate Blue Light Regulation of Stomatal Opening." *Nature* 414 (December): 656. <http://dx.doi.org/10.1038/414656a>.
- Kollist, Hannes, Maris Nuhkat, and M. Rob G. Roelfsema. 2014. "Closing Gaps: Linking Elements That Control Stomatal Movement." *New Phytologist* 203 (1): 44–62. <https://doi.org/10.1111/nph.12832>.
- Kovermann, Peter, Stefan Meyer, Stefan Ho, Cristiana Picco, Joachim Scholz-Starke, Silvia Ravera, Youngsook Lee, et al. 2007. "The Arabidopsis Vacuolar Malate Channel Is a Member of the ALMT Family." *Plant Journal* 52 (6): 1169–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03367.x>.
- Kulich, Ivan, Rex Cole, Edita Drdová, Fatima Cvrčková, Aleš Soukup, John Fowler, and Viktor Žárský. 2010. "Arabidopsis Exocyst Subunits SEC8 and EXO70A1 and Exocyst Interactor ROH1 Are Involved in the Localized Deposition of Seed Coat Pectin." *New Phytologist* 188 (2): 615–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03372.x>.
- Kulich, Ivan, Tamara Pečenková, Juraj Sekereš, Ondřej Smetana, Matyáš Fendrych, Ilse

- Foissner, Margit Höftberger, and Viktor Žárský. 2013. “Arabidopsis Exocyst Subcomplex Containing Subunit EXO70B1 Is Involved in Autophagy-Related Transport to the Vacuole.” *Traffic* 14 (11): 1155–65. <https://doi.org/10.1111/tra.12101>.
- Kulich, Ivan, Zdeňka Vojtíková, Matouš Glanc, Jitka Ortmannová, Sergio Rasmann, and Viktor Žárský. 2015. “Cell Wall Maturation of Arabidopsis Trichomes Is Dependent on Exocyst Subunit EXO70H4 and Involves Callose Deposition.” *Plant Physiology* 168 (1): 120–31. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00112>.
- Lahav, Maoz, Mohamad Abu-Abied, Eduard Belausov, Amnon Schwartz, and Einat Sadot. 2004. “Microtubules of Guard Cells Are Light Sensitive.” *Plant and Cell Physiology* 45 (5): 573–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/pcp/pch067>.
- Lake, J. A., W. P. Quick, D. J. Beerling, and F. I. Woodward. 2001. “Signals from Mature to New Leaves.” *Nature* 411 (6834): 154. <https://doi.org/10.1038/35075660>.
- Latz, A., D. Becker, M. Hekman, T. Müller, D. Beyhl, I. Marten, C. Eing, et al. 2007. “TPK1, a Ca²⁺-Regulated Arabidopsis Vacuole Two-Pore K⁺channel Is Activated by 14-3-3 Proteins.” *Plant Journal* 52 (3): 449–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03255.x>.
- Le, Jie, Xu-Guang Liu, Ke-Zhen Yang, Xiao-Lan Chen, Jun-Jie Zou, Hong-Zhe Wang, Ming Wang, Steffen Vanneste, Miyo Morita, and Masao Tasaka. 2014. “Auxin Transport and Activity Regulate Stomatal Patterning and Development.” *Nature Communications* 5: 3090. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ncomms4090>.
- Lebaudy, Anne, Alain Vavasseur, Eric Hosy, Ingo Dreyer, Nathalie Leonhardt, Jean-Baptiste Thibaud, Anne-Aliénor Véry, Thierry Simonneau, and Hervé Sentenac. 2008. “Plant Adaptation to Fluctuating Environment and Biomass Production Are Strongly Dependent on Guard Cell Potassium Channels.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (13): 5271–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0709732105>.
- Li-Cor. 2012. *Manual. Using the LI-6400/Version 6*. www.licor.com.
- Liang, Yun Kuan, Xiaodong Xie, Shona E. Lindsay, Yi Bing Wang, Josette Masle, Lisa Williamson, Ottoline Leyser, and Alistair M. Hetherington. 2010. “Cell Wall Composition Contributes to the Control of Transpiration Efficiency in Arabidopsis Thaliana.” *Plant Journal* 64 (4): 679–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04311.x>.

313X.2010.04362.x.

- Liu, Jun, James M. Elmore, Anja T. Fuglsang, Michael G. Palmgren, Brian J. Staskawicz, and Gitta Coaker. 2009. "RIN4 Functions with Plasma Membrane H⁺-ATPases to Regulate Stomatal Apertures during Pathogen Attack." *PLoS Biology* 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000139>.
- Ma, Yue, Izabela Szostkiewicz, Arthur Korte, Danièle Moes, Yi Yang, Alexander Christmann, Erwin Grill, Corrected June, and S E E Last Page. 2009. "Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors." *Science* 324 (5930): 1064 LP-1068. <http://science.sciencemag.org/content/324/5930/1064.abstract>.
- Maathuis, Frans J M. 2011. "Vacuolar Two-Pore K⁺ Channels Act as Vacuolar Osmosensors." *New Phytologist* 191 (1): 84–91. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03664.x>.
- Mackey, David, Ben F. Holt, Aaron Wiig, and Jeffery L. Dangl. 2002. "RIN4 Interacts with *Pseudomonas Syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*." *Cell* 108: 743–54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00661-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00661-X).
- Marcus, Adam I, Richard C Moore, and Richard J Cyr. 2001. "The Role of Microtubules in Guard Cell Function." *Plant Physiology* 125 (1): 387–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1104/pp.125.1.387>.
- Marom, Ziv, Ilana Shtein, and Benny Bar-On. 2017. "Stomatal Opening: The Role of Cell-Wall Mechanical Anisotropy and Its Analytical Relations to the Bio-Composite Characteristics." *Frontiers in Plant Science* 8 (December). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02061>.
- Meckel, T., A. C. Hurst, G. Thiel, and U. Homann. 2005. "Guard Cells Undergo Constitutive and Pressure-Driven Membrane Turnover." *Protoplasma* 226 (1–2): 23–29. <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0106-6>.
- Meckel, Tobias, Lars Gall, Stefan Semrau, Ulrike Homann, and Gerhard Thiel. 2007. "Guard Cells Elongate: Relationship of Volume and Surface Area during Stomatal Movement." *Biophysical Journal* 92 (3): 1072–80. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.092734>.
- Meckel, Tobias, Annette C. Hurst, Gerhard Thiel, and Ulrike Homann. 2004. "Endocytosis

- against High Turgor: Intact Guard Cells of *Vicia Faba* Constitutively Endocytose Fluorescently Labelled Plasma Membrane and GFP-Tagged K⁺-Channel KAT1.” *Plant Journal* 39 (2): 182–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02119.x>.
- Merlot, Sylvain, Françoise Gosti, Danièle Guerrier, Alain Vavasseur, Jérôme Giraudat, Á Guerrier, Alain Vavasseur, C E A Cadarache-dsv-devm, Echanges Membranaires, and U M R Cnrs-cea. 2001. “The ABI1 and ABI2 Protein Phosphatases 2C Act in a Negative Feedback Regulatory Loop of the Abscisic Acid Signalling Pathway.” *The Plant Journal* 25 (3): 295–303.
- Minguet-Parramona, Carla, Yizhou Wang, Adrian Hills, Silvere Vialet-Chabrand, Howard Griffiths, Simon Rogers, Tracy Lawson, Virgilio L. Lew, and Michael R. Blatt. 2016. “An Optimal Frequency in Ca²⁺ Oscillations for Stomatal Closure Is an Emergent Property of Ion Transport in Guard Cells.” *Plant Physiology* 170 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01607>.
- Mori, Izumi C, Reinhard Pinontoan, Tomonori Kawano, and Shoshi Muto. 2001. “Involvement of Superoxide Generation in Salicylic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia Faba*.” *Plant and Cell Physiology* 42 (12): 1383–88.
- Mott, Keith A, Erik D Sibbersen, and Joseph C Shope. 2008. “The Role of the Mesophyll in Stomatal Responses to Light and CO₂.” *Plant, Cell & Environment* 31 (9): 1299–1306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01845.x>.
- Munemasa, Shintaro, Kenji Oda, Megumi Watanabe-Sugimoto, Yoshimasa Nakamura, Yasuaki Shimoishi, and Yoshiyuki Murata. 2007. “The Coronatine-Insensitive 1 Mutation Reveals the Hormonal Signaling Interaction between Abscisic Acid and Methyl Jasmonate in Arabidopsis Guard Cells. Specific Impairment of Ion Channel Activation and Second Messenger Production.” *Plant Physiology* 143 (3): 1398–1407. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091298>.
- Munson, Mary, and Peter Novick. 2006. “The Exocyst Defrocked, a Framework of Rods Revealed.” *Nature Structural and Molecular Biology* 13 (7): 577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nsmb1097>.
- Murata, Yoshiyuki, Zhen-ming Pei, Izumi C Mori, and Julian Schroeder. 2001. “Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Ca²⁺ Channels in Guard Cells Requires Cytosolic NAD(P)H and Is Differentially Disrupted Upstream and Downstream of

- Reactive Oxygen Species Production in Abi1-1 and Abi2-1 Protein Phosphatase 2C Mutants.” *The Plant Cell* 13 (11): 2513 LP-2523. <https://doi.org/10.1105/tpc.010210.2514>.
- Murthy, Mala, Dan Garza, Richard H. Scheller, and Thomas L. Schwarz. 2003. “Mutations in the Exocyst Component Sec5 Disrupt Neuronal Membrane Traffic, but Neurotransmitter Release Persists.” *Neuron* 37 (3): 433–47. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00031-X).
- Mustilli, Anna-chiara, Sylvain Merlot, Alain Vavasseur, Francesca Fenzi, and Jérôme Giraudat. 2002. “Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production.” *The Plant Cell* 14 (12): 3089 LP-3099. <https://doi.org/10.1105/tpc.007906.ABA>.
- Nakagawa, Tsuyoshi, Takayuki Kurose, Takeshi Hino, Katsunori Tanaka, Makoto Kawamukai, Yasuo Niwa, Kiminori Toyooka, Ken Matsuoka, Tetsuro Jinbo, and Tetsuya Kimura. 2007. “Development of Series of Gateway Binary Vectors, PGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104 (1): 34–41. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.34>.
- Nakamura, R L, W L McKendree Jr, Rebecca E Hirsch, John C Sedbrook, R F Gaber, Michael R Sussman, Guard Cells, et al. 1995. “Expression of an Arabidopsis Potassium Channel Gene in Guard Cells.” *Plant Physiology* 109 (2): 371 LP-374. <http://www.plantphysiol.org/content/109/2/371.abstract>.
- Nishimura, Noriyuki, Ali Sarkeshik, Kazumasa Nito, Sang-Youl Sang-youll Park, Angela Wang, Paulo C Carvalho, Stephen Lee, et al. 2010. “PYR/PYL/RCAR Family Members Are Major In-vivo ABI1 Protein Phosphatase 2C-interacting Proteins in Arabidopsis.” *The Plant Journal* 61 (2): 290–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04054.x>.
- Osakabe, Y., N. Arinaga, T. Umezawa, S. Katsura, K. Nagamachi, H. Tanaka, H. Ohiraki, et al. 2013. “Osmotic Stress Responses and Plant Growth Controlled by Potassium Transporters in Arabidopsis.” *The Plant Cell* 25 (2): 609–24. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105700>.

- Paliwal, G S. 1967. "Ontogeny of Stomata in Some Cruciferae." *Canadian Journal of Botany* 45 (4): 495–500.
- Pantin, Florent, Fabien Monnet, Dorothée Jannaud, Joaquim Miguel Costa, Jeanne Renaud, Bertrand Muller, Thierry Simonneau, and Bernard Genty. 2013. "The Dual Effect of Abscisic Acid on Stomata." *New Phytologist* 197 (1): 65–72.
- Park, Sang-Youl, Pauline Fung, Noriyuki Nishimura, Davin R Jensen, Hiroaki Fujii, Yang Zhao, Shelley Lumba, et al. 2009. "Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins." *Science* 324 (5930): 1068 LP-1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>.
- Pečenková, Tamara, Michal Hála, Ivan Kulich, Daniela Kocourková, Edita Drdová, Matyáš Fendrych, Hana Toupalová, and Viktor Žárský. 2011. "The Role for the Exocyst Complex Subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the Plant–pathogen Interaction." *Journal of Experimental Botany* 62 (6): 2107–16. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq402>.
- Peiter, Edgar, Frans J M Maathuis, Lewis N Mills, and Heather Knight. 2005. "The Vacuolar Ca²⁺-Activated Channel TPC1 Regulates Germination and Stomatal Movement" 434 (March): 0–4. <https://doi.org/10.1038/nature03440>.
- Pilot, Guillaume, Frédéric Gaymard, Karine Mouline, Isabelle Chérel, and Hervé Sentenac. 2003. "Regulated Expression of Arabidopsis Shaker K⁺ Channel Genes Involved in K⁺ Uptake and Distribution in the Plant." *Plant Molecular Biology* 51 (5): 773–87.
- Pilot, Guillaume, Benoît Lacombe, Frédéric Gaymard, Isabelle Chérel, Jossia Boucherez, Jean-Baptiste Thibaud, and Hervé Sentenac. 2001. "Guard Cell Inward K⁺ Channel Activity In Arabidopsis Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2." *Journal of Biological Chemistry* 276 (5): 3215–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007303200>.
- Pleskot, Roman, Lukasz Cwiklik, Pavel Jungwirth, Viktor Žárský, and Martin Potocký. 2015. "Membrane Targeting of the Yeast Exocyst Complex." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1848 (7): 1481–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.026>.
- Poustka, F., N. G. Irani, A. Feller, Y. Lu, L. Pourcel, K. Frame, and E. Grotewold. 2007. "A Trafficking Pathway for Anthocyanins Overlaps with the Endoplasmic Reticulum-to-Vacuole Protein-Sorting Route in Arabidopsis and Contributes to the Formation of

- Vacuolar Inclusions.” *Plant Physiology* 145 (4): 1323–35. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105064>.
- Reliable, B, Zhen-ming Pei, Yoshiyuki Murata, Gregor Benning, Â Thomine, Birgit Klu, Gethyn J Allen, et al. 2000. “Calcium Channels Activated by Hydrogen Peroxide Mediate Abscisic Acid Signalling in Guard Cells.” *Nature* 406 (1999): 731. <http://dx.doi.org/10.1038/35021067>.
- Robinson, N G, L Guo, J Imai, E A Toh, Y Matsui, and F Tamanoi. 1999. “Rho3 of *Saccharomyces Cerevisiae*, Which Regulates the Actin Cytoskeleton and Exocytosis, Is a GTPase Which Interacts with Myo2 and Exo70.” *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3580–87. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3580>.
- Rongfeng, Huang, Zhu Meijun, Kang Yun, Chen Jia, and Wang Xuechen. 2002. “Identification of plasma membrane aquaporin in guard cells of *Vicia faba* and its role in stomatal movement.” *Acta Botanica Sinica*. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Beijing 100081; China;; College of Biological Sciences, China Agricultural University. Beijing 100094; China. <http://europepmc.org/abstract/CBA/368593>.
- Sabol, Peter, Ivan Kulich, and Viktor Žárský. 2017. “RIN4 Recruits the Exocyst Subunit EXO70B1 to the Plasma Membrane.” *Journal of Experimental Botany* 68 (12): 3253–65. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx007>.
- Saez, Angela, Nadezda Apostolova, Miguel Gonzalez-Guzman, Mary Paz Gonzalez-Garcia, Carlos Nicolas, Oscar Lorenzo, and Pedro L Rodriguez. 2004. “Gain-of-function and Loss-of-function Phenotypes of the Protein Phosphatase 2C HAB1 Reveal Its Role as a Negative Regulator of Abscisic Acid Signalling.” *The Plant Journal* 37 (3): 354–69.
- Saibo, Nelson J M, Wim H Vriezen, Gerrit T S Beemster, and Dominique Van Der Straeten. 2003. “Growth and Stomata Development of *Arabidopsis* Hypocotyls Are Controlled by Gibberellins and Modulated by Ethylene and Auxins.” *The Plant Journal* 33 (6): 989–1000.
- Sekereš, Juraj, Přemysl Pejchar, Jiří Šantrůček, Nemanja Vukašinović, Viktor Žárský, and Martin Potocký. 2017. “Analysis of Exocyst Subunit EXO70 Family Reveals Distinct Membrane Polar Domains in Tobacco Pollen Tubes.” *Plant Physiology* 173 (3): 1659–75. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01709>.

- Seo, Dong Hye, Min Yong Ahn, Ki Youl Park, Eun Yu Kim, and Woo Taek Kim. 2016. “The N-Terminal UND Motif of the Arabidopsis U-Box E3 Ligase PUB18 Is Critical for the Negative Regulation of ABA-Mediated Stomatal Movement and Determines Its Ubiquitination Specificity for Exocyst Subunit Exo70B1.” *The Plant Cell* 28 (12): 2952–73. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00347>.
- Shen, David, Hua Yuan, Alex Hutagalung, Avani Verma, Daniel Kümmel, Xudong Wu, Karin Reinisch, James A. McNew, and Peter Novick. 2013. “The Synaptobrevin Homologue Snc2p Recruits the Exocyst to Secretory Vesicles by Binding to Sec6p.” *Journal of Cell Biology* 202 (3): 509–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211148>.
- Shope, Joseph C, Daryll B DeWald, and Keith A Mott. 2003. “Changes in Surface Area of Intact Guard Cells Are Correlated with Membrane Internalization.” *Plant Physiology* 133 (3): 1314–21. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027698>.
- Sierla, Maija, Cezary Waszczak, Triin Vahisalu, and Jaakko Kangasjärvi. 2016. “Reactive Oxygen Species in the Regulation of Stomatal Movements.” *Plant Physiology* 171 (3): 1569–80. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00328>.
- Sivaram, Mylavarapu V S, Melonnie L M Furgason, Daniel N. Brewer, and Mary Munson. 2006. “The Structure of the Exocyst Subunit Sec6p Defines a Conserved Architecture with Diverse Roles.” *Nature Structural and Molecular Biology* 13 (6): 555–56. <https://doi.org/10.1038/nsmb1096>.
- Söllner, Thomas, Sidney W. Whiteheart, Michael Brunner, Hediye Erdjument-Bromage, Scott Geromanos, Paul Tempst, and James E. Rothman. 1993. “SNAP Receptors Implicated in Vesicle Targeting and Fusion.” *Nature* 362 (6418): 318–24. <https://doi.org/10.1038/362318a0>.
- Stegmann, M., R. G. Anderson, K. Ichimura, T. Pecenkova, P. Reuter, V. Zarsky, J. M. McDowell, K. Shirasu, and M. Trujillo. 2012. “The Ubiquitin Ligase PUB22 Targets a Subunit of the Exocyst Complex Required for PAMP-Triggered Responses in Arabidopsis.” *The Plant Cell* 24 (11): 4703–16. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104463>.
- Suetsugu, Noriyuki, Tsuneaki Takami, Yuuta Ebisu, Harutaka Watanabe, Chihoko Iiboshi, Michio Doi, and Ken-ichiro Shimazaki. 2014. “Guard Cell Chloroplasts Are Essential for Blue Light-Dependent Stomatal Opening in Arabidopsis.” *PLOS ONE* 9 (9):

e108374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108374>.

- Sutton, R. Bryan, Dirk Fasshauer, Reinhard Jahn, and Axel T. Brunger. 1998. "Crystal Structure of a SNARE Complex Involved in Synaptic Exocytosis at 2.4 Å Resolution." *Nature* 395 (6700): 347–53. <https://doi.org/10.1038/26412>.
- Szyroki, Alexander, Natalya Ivashikina, Petra Dietrich, M Rob G Roelfsema, Peter Ache, Birgit Reintanz, Rosalia Deeken, Matthias Godde, Hubert Felle, and Ralf Steinmeyer. 2001. "KAT1 Is Not Essential for Stomatal Opening." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (5): 2917–21.
- Taiz, Lincoln, and Eduardo Zeiger. 2010. *Lincoln Taiz*. <http://www.sinauer.com/media/wysiwyg/tocs/PlantPhysiology5.pdf>.
- Tanaka, Yoko, Natsumaro Kutsuna, Yuuko Kanazawa, Noriaki Kondo, Seiichiro Hasezawa, and Toshio Sano. 2007. "Intra-Vacuolar Reserves of Membranes during Stomatal Closure: The Possible Role of Guard Cell Vacuoles Estimated by 3-D Reconstruction." *Plant and Cell Physiology* 48 (8): 1159–69. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm085>.
- Teh, Ooi-kock, Chil-Woo Lee, Franck Aniset Ditengou, Till Klecker, Giulia Furlan, Marco Zietz, Gerd Hause, et al. 2018. "Phosphorylation of the Exocyst Subunit Exo70B2 Contributes to the Regulation of Its Function." *BioRxiv*, January, 1–30. <http://biorxiv.org/content/early/2018/02/19/266171.abstract>.
- TerBush, D R, T Maurice, D Roth, and P Novick. 1996. "The Exocyst Is a Multiprotein Complex Required for Exocytosis in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The EMBO Journal* 15 (23): 6483–94. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01039.x>.
- Trujillo, Marco, Kazuya Ichimura, Catarina Casais, and Ken Shirasu. 2008. "Negative Regulation of PAMP-Triggered Immunity by an E3 Ubiquitin Ligase Triplet in *Arabidopsis*." *Current Biology* 18 (18): 1396–1401. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.085>.
- Ueno, Kumi, Toshinori Kinoshita, Shin-ichiro Inoue, Takashi Emi, and Ken-ichiro Shimazaki. 2005. "Biochemical Characterization of Plasma Membrane H⁺-ATPase Activation in Guard Cell Protoplasts of *Arabidopsis Thaliana* in Response to Blue Light." *Plant and Cell Physiology* 46 (July): 955–63. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci104>.

- Vahisalu, Triin, Hannes Kollist, Yong Fei Wang, Noriyuki Nishimura, Wai Yin Chan, Gabriel Valerio, Airi Lamminmäki, et al. 2008. "SLAC1 Is Required for Plant Guard Cell S-Type Anion Channel Function in Stomatal Signalling." *Nature* 452 (7186): 487–91. <https://doi.org/10.1038/nature06608>.
- Wang, Fang-Fang, Hong-Li Lian, Chun-Ying Kang, and Hong-Quan Yang. 2010. "Phytochrome B Is Involved in Mediating Red Light-Induced Stomatal Opening in *Arabidopsis Thaliana*." *Molecular Plant* 3 (1): 246–59.
- Wang, Wei, Zhao Liu, Li-Juan Bao, Sha-Sha Zhang, Chun-Guang Zhang, Xin Li, Hai-Xia Li, et al. 2017. "The RopGEF2-ROP7/ROP2 Pathway Activated by PhyB Suppresses Red Light-Induced Stomatal Opening." *Plant Physiology* 174 (2): 717–31. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01727>.
- Wille, Alison C, and William J Lucas. 1984. "Ultrastructural and Histochemical Studies on Guard Cells." *Planta* 160 (2): 129–42.
- Wolfe, Joe, and Peter L. Steponkus. 1983. "Mechanical Properties of the Plasma Membrane of Isolated Plant Protoplasts: Mechanism of Hyperosmotic and Extracellular Freezing Injury." *Plant Physiology* 71 (2): 276–85. <https://doi.org/10.1104/pp.71.2.276>.
- Woolfenden, Hugh C., Gildas Bourdais, Michaela Kopischke, Eva Miedes, Antonio Molina, Silke Robatzek, and Richard J. Morris. 2017. "A Computational Approach for Inferring the Cell Wall Properties That Govern Guard Cell Dynamics." *The Plant Journal*, 5–18. <https://doi.org/10.1111/tpj.13640>.
- Wu, Hsin-i, and Peter J H Sharpe. 1979. "Stomatal Mechanics II*: Material Properties of Guard Cell Walls." *Plant, Cell and Environment* 2 (3): 235–44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.1979.tb00075.x>.
- Wu, Weihua, and Sarah M Assmann. 1993. "Photosynthesis by Guard Cell Chloroplasts of *Vicia Faba* L.: Effects of Factors Associated with Stomatal Movement." *Plant and Cell Physiology* 34 (7): 1015–22.
- Xu, Zhenzhu, and Guangsheng Zhou. 2008. "Responses of Leaf Stomatal Density to Water Status and Its Relationship with Photosynthesis in a Grass." *Journal of Experimental Botany* 59 (12): 3317–25. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern185>.
- Yamauchi, Shota, Atsushi Takemiya, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Toshifumi

- Tsutsumi, Toshinori Kinoshita, and Ken-ichiro Shimazaki. 2016. "Plasma Membrane H⁺-ATPase1 (AHA1) Plays a Major Role in Arabidopsis Thaliana for Stomatal Opening in Response to Blue Light." *Plant Physiology* 171 (August): pp.01581.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01581>.
- Žárský, V, F Cvrčková, M Potocký, and M Hála. 2009. "Exocytosis and Cell Polarity in Plants—exocyst and Recycling Domains." *New Phytologist* 183 (2): 255–72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02880.x>.
- Žárský, Viktor, Ivan Kulich, Matyáš Fendrych, and Tamara Pečenková. 2013. "Exocyst Complexes Multiple Functions in Plant Cells Secretory Pathways." *Current Opinion in Plant Biology* 16 (6): 726–33. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.10.013>.
- Zhang, Authors Xiang-ming, Sarah Ellis, Absorn Sriratana, A Christina, Tony Rowe, Xiang-Ming Zhang, Sarah Ellis, Absorn Sriratana, Christina A Mitchell, and Tony Rowe. 2004. "Sec15 Is an Effector for the Rab11 GTPase in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry*, no. 97: 1–38.
- Zhang, Wei, Liu-Min Fan, and Wei-Hua Wu. 2007. "Osmo-Sensitive and Stretch-Activated Calcium-Permeable Channels in Vicia Faba Guard Cells Are Regulated by Actin Dynamics." *Plant Physiology* 143 (3): 1140–51. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091405>.
- Zhang, Xiaoyu, Kelly Orlando, Bing He, Fengong Xi, Jian Zhang, Allison Zajac, and Wei Guo. 2008. "Membrane Association and Functional Regulation of Sec3 by Phospholipids and Cdc42." *Journal of Cell Biology* 180 (1): 145–58. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704128>.
- Zhao, Ting, Lu Rui, Juan Li, Marc T. Nishimura, John P. Vogel, Na Liu, Simu Liu, Yaofei Zhao, Jeffery L. Dangl, and Dingzhong Tang. 2015. "A Truncated NLR Protein, TIR-NBS2, Is Required for Activated Defense Responses in the Exo70B1 Mutant." *PLoS Genetics* 11 (1): 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004945>.
- Zheng, Xiao Yu, Natalie Weaver Spivey, Weiqing Zeng, Po Pu Liu, Zheng Qing Fu, Daniel F. Klessig, Sheng Yang He, and Xinnian Dong. 2012. "Coronatine Promotes Pseudomonas Syringae Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade That Inhibits Salicylic Acid Accumulation." *Cell Host and Microbe* 11 (6): 587–96. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.014>.

