

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

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Miroslava Hofírková**

Regulace otvírání a zavírání průduchů ve vztahu k osmotickému stresu

Stomata opening and closure regulation in respect to osmotic stress

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Praha, 2019

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli bakalářské práce RNDr. Michalu Hálovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady, které mi velmi pomohli během psaní závěrečné práce.

**Prohlášení:**

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

V Praze

Podpis

## Obsah

<b>1. Úvod a cíle .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Typy průduchů.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Otevírání a zavírání průduchů .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Osmotický stres .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Obecně stres u rostlin .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Reakce rostlin na osmotický stres .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Kyselina abscisová .....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Biosyntéza <i>de novo</i> .....	7
2.3.2 ABA translokace.....	8
2.3.3 Časná fáze signální dráhy ABA.....	9
2.3.4 Transkripční faktory .....	11
2.3.5 Regulace kanálů působením ABA .....	11
2.3.6 CDPK a ABA .....	12
2.3.7 MAPK.....	13
2.3.8 Sekundární poslové ABA .....	14
2.3.8.1 Reaktivní formy kyslíku .....	14
2.3.8.1.2 Peroxid vodíku .....	15
2.3.8.2 Oxid dusnatý .....	16
2.3.8.3 Lipidy.....	18
<b>2.4 Pasivní uzavírání průduchů.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Závěr .....</b>	<b>21</b>
<b>Seznam literatury.....</b>	<b>22</b>

## Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
ABA-GE	ABA-glukózový ester
ABC	angl. ATP-binding cassette
ABCG	G podskupina ABC transportérů
ABF	ABRE - transkripční faktory
ABI1	angl. ABA insensitive 1
ABRE	ABA responzivní element
ADF5	aktin depolymerizující faktor 5
AIT	angl. ABA – importing transporter
AKT1	K <sup>+</sup> kanál
AREB	regulační proteiny reagující na ABA
BG1	β-glukosidáza 1
BG2	β-glukosidáza 2
cADPR	cyklická ADP-ribóza
CAM metabolismus	angl. Crassulacean Acid Metabolism
CAT1	kataláza 1
CAT3	kataláza 3
CDPK	kalcium-dependentní proteinkináza
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CPK	cyklin-dependentní kináza
cPTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1- oxy-3-oxid
DTX/MATE	angl. multidrug and toxic compound extrusion
Fyto-S1P	fyto-sfingosin-1-fosfát
GHR1	angl. guard cell hydrogen peroxide- resistant 1
GORK	angl. guard cell outward rectifying K <sup>+</sup>
g <sub>s</sub>	vodivost průduchů
GSNO	S-nitrosogluthathion
GSNOR	GSNO reduktáza
H <sub>2</sub>	plynný vodík
HRW	angl. hydrogen-rich water
IP6	inositol hexafosfát
KAT1,2	kanály pro K <sup>+</sup>
LEA	angl. late embryogenesis abundant
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MAPKK (MKK)	MAPK kináza
MAPKKK	MAPKK kináza
MEP	plastidová dráha využívající 2-C-methyl- D-erythritol-4-fosfát
NADK2	NAD kináza 2
NBD, NBR	domény vázající nukleotidy
NCED3	9-cis-epoxykarotenoiddioxygenáza 3
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NPF	nitratové 1/peptidové transportéry
NR	nitratoreduktáza
OST1	angl. open stomata 1

PA	fosfatidová kyselina
PCAR	regulační složka ABA receptorů
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PLD $\alpha$ 1	fosfolipáza D $\alpha$ 1
PLD $\delta$	fosfolipáza D $\delta$
PP2C	proteinové fosfatázy typu 2C
PYL	angl. PYR-like
PYR	pyrobactin rezistentní
QUAC1/ATML12	aniontový kanál R-typu
Rboh-D, Rboh-F	NADPH-oxidázy typu D a F
RLK	angl. receptor-like kinases
ROS	reaktivní formy kyslíku
SLAC1	pomalý aniontový kanál 1
SLAH3	SLAC1 homolog 3
SNF1	sacharózu nefermentující proteinkináza
SnRK2	SNF-1 příbuzné proteinkinázy 2
S1P	sfingosin-1-fosfát
SPHK	sfingosinkináza
THI1	thiaminthiazolsyntáza 1
TMD	transmembránové domény
VPD	deficit tlaku vodních par
WT	angl. wild type
ZEP	zeaxantineoxidáza

## **Abstrakt**

Průduchy jsou struktury vyskytující se v epidermis vyšších rostlin, kterými primárně regulují příjem CO<sub>2</sub> a transpiraci. Během osmotického stresu průduchy hrají významnou roli v ochraně rostliny proti nadměrným ztrátám vody. Tato práce je literární rešerší shrnující regulaci průduchových pohybů během osmotického stresu. Hlavní část práce se věnuje uzavření průduchů pomocí kyseliny abscisové (ABA) během nedostatku vody pro rostlinu. V jednotlivých kapitolách je rozebrána ABA syntéza, transport a účinky na průduchy. Na základě publikovaných dat je podrobně popsána časná signální dráha ABA a regulace funkce iontových kanálů. Druhá část bakalářská práce se zaměřuje na sekundární posly, které produkuje ABA a jejich působení na regulaci průduchových pohybů. Zvláštní pozornost je věnována peroxidu vodíku a oxidu dusnatému a tomu, jak přispívají k uzavření průduchů. Poslední část se věnuje pasivnímu (hydraulickému) uzavření průduchů.

**Klíčová slova :** rostliny, průduchy, osmotický stres, ABA, průduchové pohyby

## **Abstract**

Stomata are structures located in higher plants' epidermis and they regulate mainly CO<sub>2</sub> intake and transpiration. The stomata are important for plants' protection against excessive water loss during osmotic stress. This thesis is a literary research summarizing stomatal movements regulation during osmotic stress. The main part of the thesis is focused on stomatal closure with the help of ABA under water deficiency conditions. There are the ABA synthesis, transport and its impact on stomata described in individual chapters. The ABA early signalling pathway and an ionic channel regulation are described in detail on the basis of the published data. The second part of the thesis is about second messengers produced by ABA and their impact on stomatal movement regulation. The special attention is paid to hydrogen peroxide and nitric oxide and their contribution to stomatal closure. The last part is about passive (hydraulic) stomatal closure.

**Keywords:** plants, stomata, osmotic stress, ABA, stomatal movements

## 1. Úvod a cíle

Průduchy (stomata) jsou mikroskopické póry, které jsou tvořeny párem specializovaných buněk nazývaných svěrací buňky. Ty se nacházejí v epidermis vyšších rostlin typicky na listech, ale také jsou přítomny na jiných vzdušných částech rostlin. Svěrací buňky jsou morfologicky odlišné od ostatních buněk v epidermis (Willmer and Fricker, 1996). V jejich cytoplazmě se mohou nacházet chloroplasty, které jsou téměř stejné jako v mezofylu C3 rostlin, ale většinou mají méně thylakoidů (Wise and Hooper, 2006). Okolo svěracích buněk se nachází buňky podpůrné, jejichž počet je proměnlivý. Ty společně se svěracími buňkami tvoří průduchový komplex.

První rostliny, u kterých se nacházely průduchy, rostly již před 420 miliony lety (Edwards *et al.*, 1992). Nejstarší průduchy byly objevené u raných cévnatých rostlin rodu *Cooksonia* (Edwards *et al.*, 1986). Stále se neví, zda průduchy vznikly v evoluci jednou, nebo vícekrát. Například játrovky průduchy nemají, zde se však jedná o sekundární ztrátu (Simpson, 2006). Také vodní rostliny během adaptace na vodní prostředí postupně sekundárně ztratily průduchy. Pokud vodní rostliny mají průduchy, bývá jich menší počet než u terestrických rostlin (Wells and Pigliucci, 2000).

Rostliny jsou sesilní organismy žijící v neustále měnícím se prostředí, v kterém na ně působí stresové faktory. Tyto faktory mohou mít na rostlinu negativní dopad vedoucí až k uhynutí rostliny. Jednotlivé typy stresů můžeme dělit na primární a sekundární. Osmotický stres je typ sekundárního stresu, který je u rostlin způsoben primárními stresy jako sucho, nízké teploty, vyšší obsah soli v půdě, napadení patogeny a mechanické poranění (Wang *et al.*, 2003). Vzhledem k neustálému snižování vody na planetě je osmotický stres jeden z největších problémů tohoto století. Rostlina musí přežít stresové podmínky, a tak se vyvíjejí mechanismy rezistence, které se dělí na toleranci a avoidanci. Příklad jedné z nejdůležitějších fyziologických tolerancí na osmotický stres je rozdílné otevírání a zavírání průduchů.

Cílem práce je shrnout základní informace o průduchu, popsat signální molekuly a dráhu vedoucí k uzavření průduchů rostlin během osmotického stresu.



## 1.1 Typy průduchů

Průduchy se přizpůsobují podmínkám prostředí úpravou jejich velikosti, hustoty, otevíráním a rozložením, například menší průduchy mohou reagovat rychleji při uzavírání, naopak je to u velkých (Drake *et al.*, 2013).

Počet průduchů je nejenom u různých rostlin, ale i odlišných částech rostliny, rozdílný. Stomata se liší svým umístěním na listech. Pokud se průduchy nachází na abaxiální straně listu, pak se tyto listy nazývají hypostomatické (např. jabloň), pokud na adaxiální straně epistomatické (např. lekníny) a pokud na obou amfistomatické (např. kosatec) (Dalglish *et al.*, 2014).

Rozlišujeme různé typy průduchů i průduchových komplexů. Mezi základní typy průduchů, které dnes rozeznáváme u krytosemenných rostlin, patří typ *Amaryllis*, *Graminae* a *Helleborus*. *Amaryllis* má svěrací buňky ve tvaru ledvin. Jejich stěny sousedící s pórem jsou tlustší než opačná strana směřující k podpůrným buňkám. Tento typ průduchů mají většinou jednoděložné, ale i dvouděložné rostliny. Typ *Graminae* má svěrací buňky ve tvaru činek a nachází se u jednoděložných rostlin nejčastěji u trav. Další typ průduchu krytosemenných rostlin je *Helleborus*, který má podobné ledvinovité svěrací buňky jako typ *Amaryllis*, ale má užší průduchovou šěrbinu. Vyskytují se jak u dvouděložných, tak u jednoděložných. Svěrací buňky zvyšují objem kolmo i paralelně k povrchu listu. U nahosemenných rostlin najdeme *Gymnospermní* typ, který má průduchy zanořené hlouběji v epidermis listu, a buněčné stěny obsahující lignin (např. u jehličnanů). V neposlední řadě rozeznáváme také *Pteridofytní* typ, který najdeme například u kapradin. Při zkoumání příčného řezu svěracích buněk se během zvyšování turgoru měnil tvar buněk z oválného na kulatý (Zeiger *et al.*, 1987).

Průduchové komplexy rozlišujeme na základě tvaru svěracích buněk, počtu, velikosti a upořádání podpůrných buněk. Terminologie průduchových komplexů se datuje už od práce Prantla z 19. století (Prantl, 1872). Dříve vznikaly různé klasifikace zakládající se na ontogenezi. Tato rozdělení však nebyla příliš uspokojivá, proto například Prabhakar rozlišil průduchové komplexy podle struktury na 11 různých typů. *Pericytický* typ průduchového komplexu má dvě buňky svěrací, které jsou obklopeny pouze jednou podpůrnou buňkou. *Desmocytický* typ průduchového komplexu má jednu protáhlou podpůrnou buňku, která obkružuje obě dvě buňky svěrací a vytváří spojovací stěnu buňky kolmou na průduch. *Anisotricytický* typ průduchového komplexu má tři podpůrné buňky obklopující dvě buňky svěrací, přičemž dvě podpůrné buňky jsou menší než třetí. *Isotricytický* typ průduchového komplexu má tři podpůrné buňky stejné velikosti, které obklopují dvě buňky svěrací.

Tetracytický typ průduchového komplexu má čtyři buňky podpůrné obklopující svěrací buňky, dvě v laterální a dvě v polární pozici. Staurocytický typ průduchového komplexu může mít čtyři nebo více podpůrných buněk. Buněčné stěny podpůrných buněk vytváří tvar kříže kolem svěracích buněk. Cyklocytický typ průduchového komplexu má čtyři a více podpůrných buněk, které jsou uspořádány do kruhu kolem svěracích buněk. Anomocytický průduchový komplex má čtyři nebo více podpůrných buněk, které mají proměnlivý tvar, polohu a velikost. Anisocytický typ průduchového komplexu má tři podpůrné buňky obklopující dvě buňky svěrací, z toho jedna z podpůrných buněk je výrazně menší.

U Paracytického typu průduchového komplexu obklopuje vždy jedna podpůrná buňka jednu buňku svěrací. V neposlední řadě Diacytický typ průduchového komplexu, který má dvě podpůrné buňky uspořádané tak, že společné stěny dvou těchto buněk jsou v pravém úhlu vůči podélné ose průduchu. Každý z těchto průduchových typů má ještě několik druhů (Prabhakar, 2004).

## 1.2 Otevírání a zavírání průduchů

Regulace mechanismu pohybů průduchů hraje zásadní roli v řízení fotosyntézy a výdeji vody rostlinou (transpirace). Během otevírání průduchů především dochází k transpiraci a příjmu CO<sub>2</sub>. Rostlina musí nalézt rovnováhu při výměně těchto dvou základních plynů s okolím, proto průduchy rychle reagují na měnící se environmentální podmínky jako je světlo, rostlinné hormony, patogeny, dostupnost vody, teplota a CO<sub>2</sub> (Jones, 1998). Pokud je odpařování nízké a vody je dostatek, prioritou rostliny bude příjem CO<sub>2</sub>, když nebude dostatek vody, prioritou rostliny bude přežití a tím pádem udržení vody (Luan, 2002). V případě, že by docházelo k vysoké transpiraci, nebo transpiraci při nedostatku vody, zpomaloval by se růst a vedlo by to k poškození rostlin v důsledku dehydratace.

Za normálních podmínek C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> rostliny otevírají průduchy během dne a uzavírají je v noci a tím se maximalizuje účinnost využití světla pro fotosyntézu. Tento proces otevírání průduchů na světle je řízen chloroplasty ve svěracích a mezofilních buňkách. Modré světlo indukuje otevření průduchů v semenných rostlinách, ale nevyskytuje se u kapradin druhu *Polypodiopsida* (Doi *et al.*, 2015). Receptory modrého světla jsou fototropiny (Kinoshita *et al.*, 2001). Časné cévnaté rostliny reagují na červené i modré světlo (Doi *et al.*, 2015).

Průduchy jsou regulovány i jinými faktory než je světlo a tma. Cévnaté rostliny jsou například citlivé na změny koncentrace CO<sub>2</sub>. Rostliny během vysoké koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře snižují vodivost průduchů a tím ovlivňují koncentraci CO<sub>2</sub> v mezibuněčném prostoru listu (Franks and Britton-Harper, 2016).

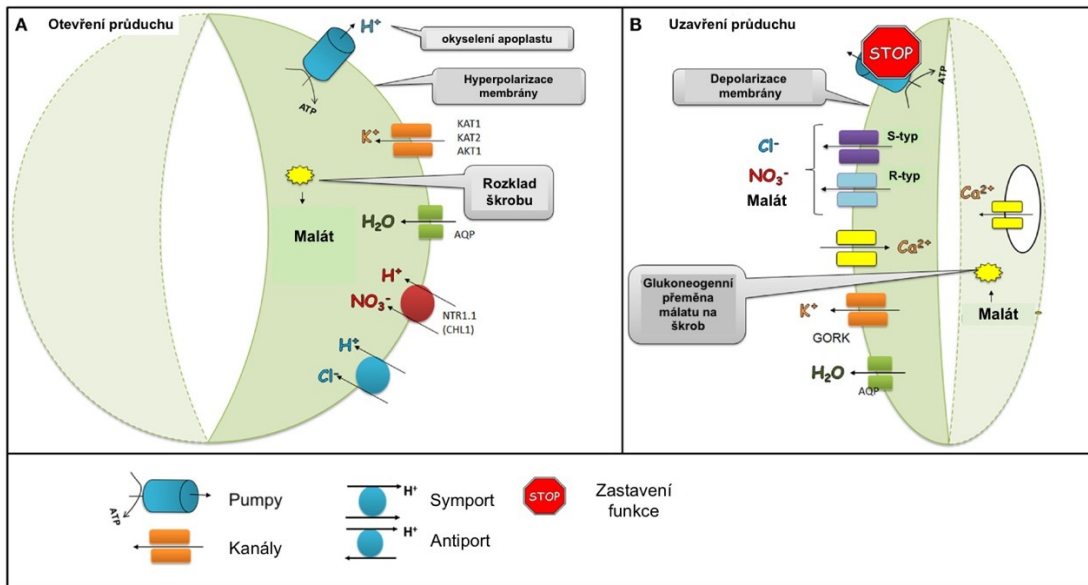
Další faktor regulace pohybů průduchů je dostatek vody. V situaci osmotického stresu se rostlinné průduchy mohou uzavírat i přes den, například u CAM metabolismu (angl. Crassulacean Acid Metabolism), který byl poprvé popsán u rostlin tučnolistých (čeleď Crassulaceae). CAM rostliny otevírají průduchy a přijímají CO<sub>2</sub> v noci, aby zabránili nadměrným ztrátám vody. Dochází tedy k časově oddělené fixaci CO<sub>2</sub>, který se ukládá ve formě malátu do vakuol od jeho využití. Rostliny využívající tento metabolismus se většinou vyskytují na suchých a horkých místech (Willmer and Fricker, 1996).

Mechanismus pohybů průduchů je regulován změnami turgoru ve svěracích buňkách, který je regulován podmínkami prostředí a hormony, aby nedocházelo k nadměrným ztrátám vody (Acharya and Assmann, 2009). K regulování průduchových pohybů jsou nezbytné pohyby osmoticky aktivních látek a proud vody přes membránu. Pohyby osmoticky aktivních látek určují vodní potenciál. Hlavní rozpuštěné látky určující vodní potenciál ve svěracích buňkách jsou K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> a malát, které se pohybují přes cytoplazmatickou membránu svěracích buněk (Willmer and Fricker, 1996). Zcela vyvinuté svěrací buňky nemají plasmodesmy, proto se rozpuštěné látky pohybují přes membránu svěracích buněk pomocí iontových kanálů, přenašečů a pump (Wille and Lucas, 1984). Iontové kanály hrají jednu z nejdůležitějších rolí v regulaci turgoru.

Během otevírání průduchů H<sup>+</sup>-ATPáza pumpuje H<sup>+</sup> ven ze svěracích buněk (Daszkowska-golec, 2016). Následně se cytoplazmatická membrána svěracích buněk hyperpolarizuje a tím se aktivují kanály KAT1, KAT2, AKT1, které slouží pro přítok K<sup>+</sup> do svěracích buněk. Také se okyseluje apoplast důsledkem výtoku H<sup>+</sup>, a to je další signál pro vtékání K<sup>+</sup> (Pilot *et al.*, 2001). Draslík je jeden z nejdůležitějších rozpuštěných prvků ve svěracích buňkách, protože se vyskytuje ve vysokých koncentracích (Humble and Raschke, 1971). Jednotky průtoku H<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup> (pmol cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) jsou o několik řádů menší než jednotky K<sup>+</sup> (nmol cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (Jin *et al.*, 2017). Tento zvýšený příjem K<sup>+</sup> je vyvážený přítokem aniontů jako jsou Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a malát<sup>2-</sup>, který se získá z metabolismu škrobu (Allaway, 1973; Daszkowska-golec, 2016). Zvyšování koncentrace osmoticky aktivních látek v cytoplazmě svěracích buněk vede k přítoku vody do těchto buněk, který způsobuje zvyšování turgoru (Nonami *et al.*, 1991).

Během uzavírání průduchů se ruší funkce H<sup>+</sup>-ATPázy a aktivují se aniontové kanály typu S (pomalý typ) a R (rychlý typ) (Daszkowska-golec, 2016). Cytoplazmatická membrána svěracích buněk je depolarizována a přes kanály S a R typu vytékají molekuly Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a malát<sup>2-</sup> (Roelfsema *et al.*, 2004). Snížená hladina malátu<sup>2-</sup> ve svěracích buňkách je způsobená jak výtokem přes aniontové kanály, tak i glukoneogenní přeměnou malátu<sup>2-</sup> na škrob (Willmer and Fricker, 1996). Poté dochází k výtoku K<sup>+</sup> ze svěracích buněk například

skrz kanál GORK (angl. guard cell outward rectifying  $K^+$ ) (Ache *et al.*, 2000). Dalším krokem při uzavírání průduchů je zvýšená koncentrace  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě svěřacích buněk, které přitékají přes kanály nacházející se na cytoplazmatické membráně svěřacích buněk a tonoplastu vakuol (MacRobbie, 2006). To vše přispívá k snížení koncentrace osmoticky aktivních látek a odtoku vody ze svěřacích buněk, který způsobuje snížení turgoru těchto buněk (Nonami *et al.*, 1991).



obr. 1: Otevírání a zavírání průduchů – regulace iontových kanálů, pump a přenašečů na cytoplazmatické membráně svěřacích buněk a tonoplastu vakuol. Mechanismus popsán v textu (převzato a upraveno (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013)).

## 2. Osmotický stres

### 2.1 Obecně stres u rostlin

Larcher definoval stres rostlin jako „stav, ve kterém rostoucí nároky kladené na rostlinu vedou k počáteční destabilizaci funkcí, následované normalizací a zlepšení rezistence. Pokud je překročen limit tolerance a adaptivity, může stres způsobovat trvalé poškození nebo dokonce smrt“ (Larcher, 1987). Rozlišujeme dva typy stresu eu-stres a di-stres. Eu-stres je mírný, stimulující a pozitivní pro rostlinu, naproti tomu di-stres je silný negativní stres poškozující rostlinu. Mírný eu-stres může být pro rostlinu přínosný.

Stres nejčastěji rozdělujeme na 4 fáze. První fáze, poplachová (alarmová), nastává hned po začátku působení stresoru a během této fáze se narušují struktury a dochází k poklesu vitality rostliny. V druhé fázi začínají opravy a adaptační procesy. Během třetí fáze se krátce zvyšuje

odolnost rostliny. Poslední fáze je vyčerpání, po dlouhodobém působení silného negativního stresu. Lichtenthaler přidal k definici stresu ještě regenerační fázi. Regenerační fáze nastává pouze v případě odstranění stresoru a pokud působení stresu nebylo příliš dlouhé a silné (Lichtenthaler, 1998).

Faktory, které způsobují stres u rostlin, rozlišujeme na biotické a abiotické. Abiotický stres je způsobený podmínkami prostředí. Mezi abiotické faktory řadíme například nízkou a vysokou teplotu, hypoxii, anoxii, vyšší obsah sole v půdě, ozón, nedostatečné nebo nadměrné světelné ozáření, těžké kovy, nevyváženou minerální výživu, mechanické zranění a další (Hirayama and Shinozaki, 2010). Biotický stres způsobují interakce s živými organismy. Rostliny jsou neustále napadány virovými, bakteriálními i houbovými patogeny. Mezi biotické faktory také patří parazitické rostliny a býložravý hmyz (Aldea *et al.*, 2006).

## **2.2 Reakce rostlin na osmotický stres**

Reakce rostliny na osmotický stres zahrnuje aktivaci mnoha genů, biochemických a molekulárních mechanismů. Primární účinky stresu nejsou většinou pro rostlinné buňky významným problémem a pomáhají rostlině přežít. Při těchto účincích stresu se rostliny začnou přizpůsobovat na osmotický stres pomocí fyziologických, anatomických a morfologických změn. Mezi tyto změny patří například zanoření průduchů, zvýšený počet trichomů kolem průduchu, otevírání průduchů v noci, zvýšený příjem vody a další. Aklimatizace rostliny na osmotický stres je indikována akumulací metabolitů spojených se strukturálními změnami za účelem zlepšení fungování rostliny. Při dlouhodobém působení osmotického stresu může docházet k vadnutí, zastavení růstu a k poškození rostliny. Existují různé faktory ovlivňující působení stresu na rostlinu, jako druh a rozmanitost rostliny, doba trvání stresu, intenzita působení stresu, podmínky prostředí, růst rostlin i fenologický stav (Lisar *et al.*, 2012).

Uzavření průduchů je jedna z důležitých a známých fyziologických reakcí rostliny, která souvisí s nedostatkem vody v půdě a je řízena hlavně chemickými signály. Uzavření může být poháněno jak aktivním (kyselina abscisová), tak pasivním (hydraulickým) mechanismem (McAdam & Brodribb, 2014).

## **2.3 Kyselina abscisová**

Kyselina abscisová (ABA) má v rostlině několik funkcí. Jedna z nejdůležitějších funkcí tohoto fytohormonu je aklimace a adaptace na suché, studené prostředí nebo při zvýšeném

obsahu soli v půdě (Boussiba *et al.*, 1975; Larosa *et al.*, 1985). Osmotický stres způsobuje zvyšování koncentrace ABA v rostlině, která zahajuje signální kaskádu vedoucí k uzavření průduchů zabraňující nadměrným ztrátám vody (Schroeder *et al.*, 2001).

Po chemické stránce kyselina abscisová patří mezi seskviterpeny. Může být v aktivní, ale i v neaktivní formě uložena ve vakuole nebo apoplastu. Inaktivace ABA nastává buď hydroxylací nebo konjugací s deriváty glukózy za vzniku ABA-glukózového esteru (ABA-GE) (Pareek *et al.*, 2010). V rostlinných buňkách se tedy vyskytuje jak volná ABA, tak inaktivní ABA-GE. V půdě se ABA-GE vyskytuje ve vyšší koncentraci než ABA, která se dostává do půdy z rostlinných kořenů a činností půdních mikroorganismů (Hartung *et al.*, 1996). Některé bakterie, jako jsou například *Bacillus licheniformis* a *Pseudomonas fluorescens* nacházející se v kořenech a rhizosféře vinné révy, mohou produkovat a vyvolávat syntézu ABA, která napomáhá rostlině zmírnit vliv sucha (Salomon *et al.*, 2014). Pokud by půda neobsahovala kyselinu abscisovou, docházelo by k jejímu velkému vylučování z kořenů rostlin do půdy (Hartung *et al.*, 1996).

Jestliže hypodermis a endodermis rostliny obsahuje Casparyho proužky, tak vnější ABA-GE nemůže volně procházet z půdy do rostlinných buněk (Freundl *et al.*, 2000). V případě nepřítomnosti hypodermis s Casparyho proužkami je vnější ABA-GE přijímána do apoplastu kořenového kortexu, který obsahuje hydrolytické enzymy štěpící ABA-GE (Hartung *et al.*, 2002). Mezi tyto enzymy patří apoplastická  $\beta$ -glukosidáza (BG1), která hydrolyzuje ABA-GE a tím vznikne volná ABA. Ztráta BG1 způsobuje poškození průduchových pohybů, časné vyklíčení a nižší hladiny ABA (Lee *et al.*, 2006). Další  $\beta$ -glukosidáza, BG2, hydrolyzuje exogenní ABA-GE a tím se zvyšuje hladina ABA v protoplastu buněk (Xu *et al.*, 2012).

Koncentrace endogenní ABA rostliny je regulována změnami podmínek prostředí, a to tak, že rostliny rozpoznávají nedostatek vody svými kořeny a tento signál vede k zvýšení koncentrace ABA v rostlinných buňkách (Pareek *et al.*, 2010). Rostlina může ABA získávat z míst, kde je uložena ve vakuolách a apoplastu, štěpením ABA-GE nebo biosyntézou *de novo*. Přičemž hydrolyza ABA-GE na ABA pravděpodobně přispívá jen k velmi malé části zvýšených hladin ABA během stresu (Sauter *et al.*, 2002).

### **2.3.1 Biosyntéza *de novo***

Při nízkém deficitu tlaku vodních par (VPD) je vysoký turgor v buňkách rostliny a v tomto případě ABA není syntetizována. Naopak při vysokém VPD je nízký turgor v buňkách rostliny. Změněný turgor je pravděpodobně signálem, který spouští rychlou aktivaci

9-cis-epoxykarotenoiddioxygenázy 3 (NCED3) a tento enzym napomáhá zvýšení koncentrace ABA v rostlině (Susmilch *et al.*, 2017). V průběhu osmotického stresu může být ABA syntetizována jak v kořenech, tak i v listech (Hartung *et al.*, 2002).

ABA je typ rostlinného hormonu, který patří mezi izoprenoidní látky, a je syntetizována cestou nezávislou na mevalonové kyselině (MEP – plastidová dráha využívající 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát). Uhlíkový skelet C<sub>15</sub> hlavního řetězce ABA je konečným produktem štěpení karotenoidů C<sub>40</sub> syntetizovaných v plastidech. Biosyntéza ABA ze začátku probíhá v plastidech a končí v cytoplazmě. První krok biosyntézy nastává tak, že enzym zeaxantinepoxidáza (ZEP) převádí C<sub>40</sub> karotenoid zeaxantin na trans-violaxantin, který se dále izomerizuje na cis-violaxantin izomeračním postupem. Dochází k oxidativnímu štěpení cis-violaxantinu a vzniká xantoxin, jehož vznik je katalyzován enzymem NCED3. Xantoxin se přenesse do cytoplazmy a tam se převádí na ABA přes meziproduct aldehyd kyseliny abscisové (Trivedi *et al.*, 2016; Susmilch *et al.*, 2017).

### 2.3.2 ABA translokace

Translokace kyseliny abscisové mezi buňkami, pletivy a orgány hraje důležitou roli v fyziologické odezvě rostlin na stresové stavy. ABA může být přepravována pasivní difúzí z míst s nízkým do míst s vyšším pH, ale i pomocí transportérů (Osakabe *et al.*, 2014).

ABA je z kořenů vedená do svěřacích buněk pomocí xylému, kde se většinou nehromadí. Po dokončení uzavření průduchů je rychle degradovaná (Hartung, *et al.*, 2002). Naopak ABA vzniklá v listech je vedena floémem do míst spotřeby. V kořenech se ABA z floému ukládá nebo recirkuluje do xylému. Recirkulace ABA je ovlivněna hladinou fosforu, při nedostatku fosforu se zvyšuje (Jeschke *et al.*, 1997).

Obecně rostlinné ABC transportéry (angl. ATP-binding cassette) jsou všudypřítomné proteiny na cytoplazmatické membráně, které fungují při importu/exportu různých molekul jako jsou hormony, cukry, lipidy a další. ABC transportéry patří do skupiny přenašečů poháněných ATP sestávajících ze dvou hydrofobních transmembránových domén (TMD), které tvoří pór nacházející se v membráně, a dvou cytoplazmatických domén známých jako domény vázající nukleotidy (NBD nebo NBR), které váží ATP. TMD jsou umístěny na C-konci proteinu a obsahují více  $\alpha$ -helixů (kolem 4-6) spojených s membránou, které společně umožňují transport přes lipidovou dvojvrstvu cytoplazmatické membrány. Dvě NBD jsou odpovědné za navázání a hydrolýzu ATP (Holland *et al.*, 2003). Transportní cyklus ABC transportéru začíná vazbou k substrátu a poté následuje vazba ATP, která vyvolává změny

potřebné pro zahájení transportního cyklu. Hydrolyza ATP funguje k obnovení bazální konformace transportéru (Higgins and Linton, 2004).

Podskupina G ABC transportérů (ABCG) zprostředkovává translokaci ABA (Koo *et al.*, 2011). Mezi jedny z nejdůležitějších transportérů z této skupiny patří ABCG25 a ABCG40. ABCG25, který je exprimován hlavně ve vodivých pletivech, je schopen exportovat ABA z vnitřku buňky do apoplastu. Jeho nadměrná exprese vede ke zvýšení teploty listů v důsledku zvýšeného uzavření průduchů (Kuromori *et al.*, 2010). Naproti tomu ABCG40 je schopen importovat kyselinu abscisovou z vnějšku do vnitřku svěřacích buněk. U mutanta *abcg40* bylo pozorováno zhoršené uzavírání průduchů během působení exogenní kyseliny abscisové a snížená tolerance sucha (Kang *et al.*, 2010).

Další transportéry ABA patří do skupiny nitrátových 1/peptidových transportérů (NPF), které byly původně identifikovány jako transportéry dusičnanů nebo di/tri-peptidů. Tyto transportéry přenášejí z rostlinných hormonů nejenom ABA, ale i auxin, gibbereliny a sekundární metabolity (Chiba *et al.*, 2015). V huseníčku jsou čtyři hlavní NPF, NPF4.1/AIT3 (angl. ABA - importing transporter), NPF4.2/AIT4, NPF4.5/AIT2 a NPF4.6/AIT1, které transportují ABA. Například NPF4.6/AIT1 přenašeč slouží k importu kyseliny abscisové a je důležitý pro řízení uzavření průduchů ve stoncích květenství (Kanno *et al.*, 2012). Také ostatní členy NPF rodiny jako například NPF1.1, NPF2.5, NPF5.1, NPF5.2, NPF5.3, NPF5.7 a NPF8.2 jsou schopné translokace ABA (Chiba *et al.*, 2015).

I transportéry DTX/MATE (angl. Multidrug and Toxic Compound Extrusion) slouží k přepravě ABA. Například DTX50 funguje při výtoku ABA z cytoplazmy svěřacích buněk do apoplastu a je exprimován hlavně ve vodivých pletivech a svěřacích buňkách. DTX50 usnadňuje odtok ABA ze svěřacích buněk a tím reguluje koncentraci exogenní ABA (Zhang *et al.*, 2014).

### 2.3.3 Časná fáze signální dráhy ABA

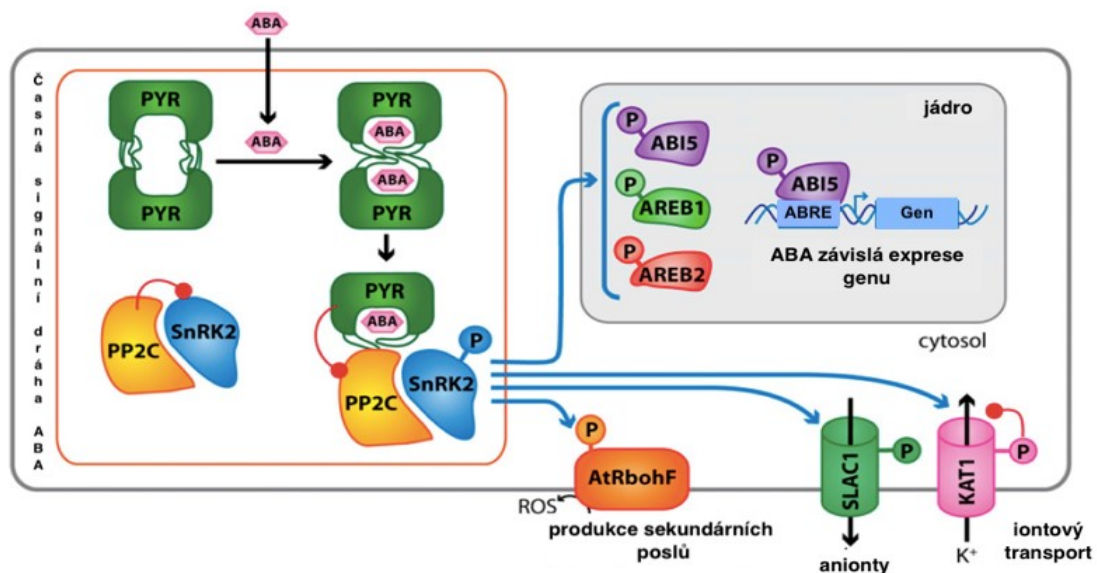
Signální cesta ABA se skládá z regulace membránových iontových kanálů, kináz, fosfatáz a transkripčních faktorů.

Časná fáze signální dráhy kyseliny abscisové při vyvolávání uzavření průduchů začíná tak, že se hormon naváže na receptory PYR (pyrabactin rezistentní)/PYL (angl. PYR1-like)/PCAR (regulační složka ABA receptorů) a společně vytvoří ABA-receptorový komplex. Proteinové fosfatázy typu 2C (PP2C) se v nepřítomnosti ABA váží na SnRK2 (SNF-1 (sacharóza nefermentující proteinkináza 1) příbuzné proteinkinázy 2) a inhibují jejich



kinázovou aktivitu odstraněním aktivačních fosfátů. V přítomnosti ABA se vytváří ABA-receptorový komplex, který se váže na PP2C a tím inhibuje jejich katalytickou aktivitu. Tato vazba zabraňuje aktivitě PP2C tím, že blokuje přístup k substrátu (Soon *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2009). Současně je uvolněna SnRK2 a dochází k fosforylaci cílových proteinů. Mezi hlavní SnRK2 patří například SnRK2.6/OST1 (angl. open stomata 1), SnRK2.2 a SnRK2.3. Několik cílů SnRK2 je jak na cytoplazmatické membráně svěřacích buněk, tak v jádře, což způsobuje regulaci iontových kanálů, produkci sekundárních posílů a genovou expresi. Bylo identifikováno několik cílů SnRK2, například pomalý aniontový kanál 1 (SLAC1) na cytoplazmatické membráně svěřacích buněk, NADPH-oxidáza RbohF vytvářející ROS, základní AREB (regulační proteiny reagující na ABA) a kanál KAT1, který je fosforylací inhibován (Fujita *et al.*, 2009; Hubbard *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2009; Sirichandra *et al.*, 2009).

Mimo OST1, SnRK2.2 a SnRK2.3 známe i další kinázy, například kinázy závislé na vápníku jako jsou cyklin-dependentní kinázy (CPK), kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPK) nebo GHR1 (angl. guard cell hydrogen peroxide-resistant 1), které přispívají k uzavření průduchů vyvolaného ABA (Brandt *et al.*, 2015; Hua *et al.*, 2012).



obr. 2: Časná signální dráha ABA ve svěřacích buňkách. Mechanismus popsán v textu. (Převzato a upraveno (Hubbard *et al.*, 2010))

### 2.3.4 Transkripční faktory

Transkripční faktory AREB a ABF (ABRE - transkripční faktory) jsou fosforylovány proteinkinázou SnRK2 během časně fáze signální dráhy ABA (Fujita *et al.*, 2009). ABF/AREB jsou klíčovými transkripčními faktory zprostředkovávajícími signalizaci ABA při osmotickém stresu a to tak, že regulují ABRE (ABA responzivní element) - dependentní genovou expresi (Wang *et al.*, 2019). Mezi hlavní transkripční faktory řídící ABRE-závislou genovou expresi ABA během působení osmotického stresu patří AREB1, AREB2 a ABF3 (Yoshida *et al.*, 2010). Ty se nacházejí v jádře a regulují expresi genů skrze ABRE. Mezi tyto geny patří regulační geny a geny ze třídy LEA (angl. late embryogenesis abundant), které napomáhají rostlině během nedostatku vody (Fujita *et al.*, 2005). U trojitého mutantu *areb1, areb2* a *abf3* byla pozorována zvýšená necitlivost na ABA a snížená tolerance vůči suchu (Yoshida *et al.*, 2010).

Transkripční faktory ABF/AREB a ADF5 (aktin depolymerizující faktory) mohou představovat potenciální vazbu mezi signalizací ABA a aktinovým cytoskeletem během uzavření průduchů. ADF5 je regulován pomocí signalizace ABA na transkripční úrovni a remodeluje aktinový cytoskelet během průduchových pohybů. Ztráta funkce ADF inhibuje uzavření průduchů snížením koncentrace aktinových filament ve svěracích buňkách. Z toho vyplývá, že ADF mohou regulovat průduchové pohyby vyvolané ABA během osmotického stresu. Nejenom ADF5, ale i další ADF1/2/3/4/6 jsou zapojeny do signalizačních drah ABA (Qian *et al.*, 2018).

### 2.3.5 Regulace kanálů působením ABA

ABA reguluje několik iontových kanálů na cytoplazmatické membráně svěracích buněk a tonoplastu vakuol (Schroeder *et al.*, 2001). Během uzavření průduchů, které vyvolává ABA, dochází k změně koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  a aniontů v cytoplazmě svěracích buněk.

Vnitřní zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  je sekundárním poslem uzavření průduchů. ABA zvyšuje koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě svěracích buněk vtokem z extracelulárního prostoru a uvolňováním z intracelulárních zásob (MacRobbie, 2000). Také cyklická ADP-ribóza (cADPR), kterou stimuluje ABA, zvyšuje koncentraci cytoplazmatických  $\text{Ca}^{2+}$  ve svěracích buňkách (Leckie *et al.*, 1998). Zvyšující koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  ve svěracích buňkách inhibuje aktivitu  $\text{H}^+$ -ATPázy (Kinoshita *et al.*, 1995).

Další krok při uzavření průduchů je aktivace kanálů S a R typu, které vyvolávají aniontový výtok a tím spolu s inhibicí  $\text{H}^+$ -ATPázy depolarizaci cytoplazmatické membrány svěracích

buněk (Kinoshita *et al.*, 1995; Roelfsema *et al.*, 2004). Aktivace S-typu kanálů je jedna z klíčových událostí při uzavírání průduchu. Mezi hlavní aniontové kanály S-typu ve svěřacích buňkách patří SLAC1 a SLAH3 (SLAC1 homolog 3). Oba tyto kanály většinou převážně inhibují aktivitu KAT1 a následně zabraňují otevření průduchu, avšak neinhibují kanál stejnou mírou. SLAH3 inhibuje KAT1 v menší míře než SLAC1 (Wang *et al.*, 2016). U mutantů v genu SLAC1 bylo pozorováno narušení uzavírání průduchů způsobené zhoršenou aktivací aniontových kanálů S-typu, ale neovlivňují se kanály typu R a kanály pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Mutant *slac1* vykazuje necitlivost na ABA a  $\text{H}_2\text{O}_2$  a mají sníženou toleranci vůči osmotickému stresu (Vahisalu *et al.*, 2008). Jeden z hlavních kanálů R-typu je QUAC1/ALTM12 (Linder and Raschke, 1992). U mutantů *altm12* nedochází k uzavření průduchů, které je vyvolané tmou nebo  $\text{CO}_2$ . To naznačuje, že aktivita ALTM12 je nezbytná k uzavření průduchů (Meyer *et al.*, 2010).

Depolarizace cytoplazmatické membrány je primární síla pro výtok  $\text{K}^+$  ze svěřacích buněk. ABA způsobuje alkalizaci cytoplazmy svěřacích buněk a tím zvyšuje aktivitu vytékání  $\text{K}^+$  ze svěřacích buněk. Výtok  $\text{K}^+$  přes cytoplazmatickou membránu svěřacích buněk probíhá především skrze GORK kanál (Hosy *et al.*, 2003). Také dochází k inhibici kanálů pro vtok  $\text{K}^+$  do cytoplazmy svěřacích buněk (Sato *et al.*, 2009).

Snížením koncentrace osmoticky aktivních látek v cytoplazmě svěřacích buněk dochází k odtoku vody, který vede k snížení turgoru ve svěřacích buňkách a uzavření průduchu.

### 2.3.6 CDPK a ABA

CDPK (někdy také CPK) mají klíčovou roli při regulaci růstu a vývoje rostlin během působení biotických a abiotických stresových faktorů. Několik CDPK, převážně ty, které se nacházejí ve svěřacích buňkách, se podílí na regulaci mechanismu pohybů průduchů během osmotického stresu.

U mutantů postrádající CDPK bylo pozorováno zhoršené řízení iontových kanálů svěřacích buněk, které aktivuje ABA, protože tyto proteinkinázy regulují aktivitu iontových kanálů, fungují jako senzory  $\text{Ca}^{2+}$  a jejich hlavní úloha je aktivace  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů ve svěřacích buňkách (Zou *et al.*, 2015).

Například CPK10 i CPK13 jsou důležité proteinkinázy účastníci se řízení průduchových pohybů během stresu ze sucha, které jsou zprostředkovány skrze ABA a  $\text{Ca}^{2+}$  (Zou *et al.*, 2010). CPK13 společně s ABA a  $\text{Ca}^{2+}$  se podílí na inhibici  $\text{K}^+$  kanálů KAT1 a KAT2. Při nadměrné expresi CPK13 dochází k inhibici otevření průduchů, které je vyvolané světlem

(Ronzier *et al.*, 2014). Další proteinkinázy řídící kanály potřebné pro uzavření průduchů, jsou CPK21 a CPK23 regulující kanál SLAC1 (Geiger *et al.*, 2010). Nejenom CPK23, ale i CPK3 a CPK6 mají funkci v řízení aniontových kanálů S-typu prostřednictvím ABA a  $\text{Ca}^{2+}$ , ale navíc i v ABA vyvolané regulaci  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů (Mori *et al.*, 2006).

CPK8 hraje roli v zavření průduchů prostřednictvím fosforylace katalázy 3 (CAT3). Důležitost této proteinkinázy můžeme pozorovat u mutantů *cpk8* a *cat3*, kde dochází k snížené inhibici  $\text{K}^+$  kanálů sloužící pro vtok  $\text{K}^+$  do svěřacích buněk během uzavření průduchů vyvolaného ABA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . Mutanti *cpk8* jsou více citliví na sucho než WT (angl. wild type). Z toho vyplývá, že CPK8 je pozitivní regulátor v signalizaci ABA vedoucí k uzavření průduchů během osmotického stresu (Zou *et al.*, 2015).

CPK33 interaguje s thiaminthiazolsyntázou 1 (THI1) a je negativní regulátor uzavření průduchů vyvolaného ABA. Při větší expresi THI1 jsou rostliny více citlivé na ABA a při ztrátě CPK33 dojde k zvýšenému množství aktivovaných kanálů S-typu, přičemž nadměrná exprese CPK33 má opačný vliv. THI1 je tedy pozitivní regulátor ABA signalizace ve svěřacích buňkách, protože negativně reguluje CPK33 při uzavření průduchů regulovaného ABA (Li *et al.*, 2016).

### 2.3.7 MAPK

Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) mají důležitou roli v přenosu signálů ABA a to takovou, že proteinkinázové dráhy spojují signály reaktivních forem kyslíků (ROS), které zprostředkovávají buněčnou odezvu na biotický a abiotický stres. ROS jsou vyžadovány pro aktivaci MAPK v přenosu signálu kyseliny abscisové v rostlinách to znamená, že přispívají k regulaci uzavření průduchů. Aktivované MAPK poté vedou k zvýšení produkce  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Zhang *et al.*, 2006). Signalizační kaskáda MAPK se skládá ze tří tříd enzymů: MAPK, MAPK kináza (MAPKK) a MAPKK kináza (MAPKKK).

ABA aktivuje MAPK signální kaskádu, která se skládá z MAPKKK17/MAPKKK18, MKK3, MAPKK a čtyř kináz z C skupiny MPK 1/2/7/14 (Danquah *et al.*, 2015). Během působení osmotického stresu začíná endogenní syntéza a signalizace ABA, což stimuluje transkripci MAPKKK18. Ta je specificky exprimována ve svěřacích buňkách a musí být aktivována kinázou, receptorovou kinázou nebo jiným typem proteinkinázy v reakci, kterou vyvolává ABA (Li *et al.*, 2017). Tato kináza se podílí na reakcích souvisejících s vývojem průduchu, průduchovými pohyby, inhibicí klíčivosti zprostředkovanou ABA a růstem kořenů. U mutantů ztráta funkce kinázy vede k inhibici uzavírání průduchů a k fenotypu s více

otevřenými průduchy a naopak nadměrná exprese způsobuje uzavření průduchů hypersenzitivní k ABA (Mitula *et al.*, 2015). MAPKKK18, ale i MAPKKK17 je regulována působením ABA a vede k aktivaci MAPK skupiny C pomocí MKK3. Tato kaskáda MAPK může přispívat k vytvoření signálu pro vyvolání reakcí závislých na ABA a fosforylace těchto proteinkináz podporuje regulaci fyziologických změn i metabolismu během dlouhodobého působení osmotického stresu (Danquah *et al.*, 2015).

Mezi další důležité MAPK, které regulují ABA signalizaci, patří MPK3, MKP6 a MKK1. Například při snížené aktivitě MPK3 dochází u rostlin k horší kontrole prostřednictvím ABA a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nad průduchy a průduchovými pohyby (Gudesblat *et al.*, 2007). MKK1 a MPK6 se účastní signalizační kaskády závislé na ABA, která vede k produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Při nadměrné expresi MPK6 nebo MKK1 dochází k zesílení exprese CAT1 (kataláza 1) závislé na ABA a produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CAT1 je důležitá pro rostlinu během osmotického stresu, protože kontroluje katabolismus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a tím ovlivňuje koncentraci buněčné H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a má důležitou roli během adaptace rostlin na různé varianty stresů (Xing *et al.*, 2008).

## 2.3.8 Sekundární poslové ABA

### 2.3.8.1 Reaktivní formy kyslíku

ROS primárně regulují vývoj a růst rostlin během biotických a abiotických stresů, ale pokud jsou produkovány více než je potřeba, mohou mít škodlivý účinek na rostlinu a vyvolat buněčnou smrt. Proto produkce ROS musí být přísně regulována, aby se vyvážila jejich funkce. Mezi hlavní ROS ve vztahu k osmotickému stresu patří superoxid O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, hydroxylové radikály (OH•) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (You and Chan, 2015).

Interakce mezi ABA a ROS může být buď synergická nebo antagonistická, záleží na rostlinném orgánu a situaci. Například během osmotického stresu je interakce synergická napomáhá uzavření průduchů, a to tím, že ROS zprostředkovávají signalizaci ABA ve svěracích buňkách. Antagonistická interakce nastává například při klíčení semen, ABA zabraňuje stimulaci produkce ROS v embryu (El-Maarouf-Bouteah *et al.*, 2015).

ROS jsou v rostlině neustále produkovány v mitochondriích, chloroplastech a peroxisomech (Foyer and Noctor, 2003). ROS jsou produkovány během osmotického stresu ve svěracích buňkách, pomocí proteinů z rodiny RboH, známé jako rostlinné NADPH-oxidázy. Při nedostatku vody rostlinný hormon ABA spouští produkci ROS ve svěracích buňkách prostřednictvím NADPH-oxidáz typu RboH-D a RboH-F (Kwak, 2003). Produkce je spuštěna v ten moment, kdy dochází k transportu ABA do svěracích buněk a příslušná SnRK2

kináza, jako je OST1, fosforyluje NADPH-oxidázu. Tímto postupem dochází k akumulaci ROS (Sirichandra *et al.*, 2009). K produkci ROS jsou také zapotřebí fosfolipázy PLD $\alpha$ 1 (fosfolipáza Da1) a PA (fosfatidová kyselina), které spadají mezi sekundární posly ABA (Zhang *et al.*, 2009).

### 2.3.8.1.2 Peroxid vodíku

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je signální molekula reakcí rostlin na stresové faktory. Zvyšující se koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve svěracích a podpůrných buňkách patří mezi sekundární posly při uzavření průduchů během nedostatku vody. Zvýšení koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v podpůrných buňkách při osmotickém stresu naznačuje přítomnost kanálů pro H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v cytoplazmatické membráně svěracích a podpůrných buněk (Yao *et al.*, 2013).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je pozitivním regulátorem uzavření průduchů vyvolaného ABA (León *et al.*, 2014). ABA spouští produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve svěracích buňkách, poté aktivuje Ca<sup>2+</sup> kanály v cytoplazmatické membráně svěracích buněk a tím napomáhá k uzavření průduchu během osmotického stresu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> může vyvolávat uzavření průduchů i nezávisle na ABA, začne vyvolávat změny cytoplazmatického a vakuolárního pH ve svěracích buňkách, které jsou způsobeny pomocí odtoku H<sup>+</sup> z cytoplazmy do vakuol svěracích buněk přes vakuolární H<sup>+</sup>-ATPázu (Zhang *et al.*, 2001). Také stimuluje přechodné zvýšení koncentrace Ca<sup>2+</sup> ve svěracích buňkách a inhibuje K<sup>+</sup> kanály transportující draselné ionty směrem dovnitř cytoplazmy svěracích buněk (McAinsh *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2001).

GHR1, který se nachází na cytoplazmatické membráně rostlinných buněk, patří mezi RLK (angl. receptor-like kinases) a zprostředkovává aktivaci Ca<sup>2+</sup> kanálů a aniontových kanálů S-typu. Stejně jako OST1 fosforyluje SLAC1 a jiné substráty pro regulaci Ca<sup>2+</sup> kanálů nebo přímo Ca<sup>2+</sup> kanály. U mutantu *ghr1* dochází k větším ztrátám vody než u WT, protože má poškozenou aktivaci aniontových kanálů S-typu a Ca<sup>2+</sup> kanálů, kterou vyvolává ABA a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Z toho plyne, že GHR1 patří v signální dráze ABA mezi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a aktivaci Ca<sup>2+</sup> kanálů. Homology GHR1 jsou přítomny v genomech jednoděložných i dvouděložných rostlin, což naznačuje, že široká škála plodin může mít podobný molekulární mechanismus pro regulaci mechanismu pohybů svěracích buněk zprostředkovaných ABA a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> během osmotického stresu (Hua *et al.*, 2012).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interaguje s NO, obě dvě látky patří mezi klíčové molekuly v signalizaci uzavření průduchů vyvolaného ABA. Odstraněním hlavních zdrojů NO a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se výrazně zeslabí uzavření průduchů regulované ABA. Mezi jejich časovou a prostorovou signalizací existuje

velmi těsný vztah. Signální dráha během osmotického stresu začíná tvorbou ABA, což může zahájit produkci  $H_2O_2$  a ta vede k tvorbě NO, který indukuje uzavření průduchů (Fancy *et al.*, 2017). Důležitá část této signální dráhy je alkalizace cytoplazmy, která předchází produkci ROS a NO během uzavření průduchů prostřednictvím ABA. Cytoplazmatické pH je dalším z důležitých druhých poslů při uzavření průduchu prostřednictvím ABA. Jeho zvyšování vede k zesílení produkce ROS i NO ve svěracích buňkách (Gonugunta *et al.*, 2009).

Plynný vodík ( $H_2$ ), jehož produkci a uvolňování z HRW (angl. hydrogen-rich water) vyvolává ABA, může regulovat průduchové pohyby vyvolané ABA.  $H_2$  signalizační kaskáda závislá na ABA zahrnuje produkci ROS závislou na RbohF, nitrátreduktázu (NR) spojenou s produkcí NO a následnou aktivací kanálu GORK.  $H_2$  pozitivně reguluje produkci  $H_2O_2$  podporovanou ABA a uzavření průduchů během osmotického stresu (Xie *et al.*, 2014).

ABA i  $H_2O_2$  indukují zvýšenou koncentraci NO v cytoplazmě svěracích buněk a pokud dojde k odstranění NO pomocí NO lapače cPTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxy-3-oxid) během uzavření průduchů indukovaném  $H_2O_2$ , bude toto uzavření inhibováno (Bright *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2008). Na druhou stranu uzavření průduchů indukované NO nepotřebuje k svému dovršení syntézu  $H_2O_2$ , ale potřebuje endogenní produkci  $H_2O_2$  na počátku, kdy je nutná pro syntézu NO. Tento vztah byl zkoumán u mutantů *atrbohD/F*, kteří nedokáží syntetizovat NO během působení ABA a tím je výrazně zhoršeno uzavření průduchů (Bright *et al.*, 2006).

NAD-kináza 2 (NADK2) hraje roli při biosyntéze NADP chloroplastů, adaptaci na sucho a modulaci buněčného metabolismu. NADK2 ovlivňuje ABA vyvolané průduchové pohyby během osmotického stresu. Mutace NADK2 narušuje uzavření průduchů vyvolané ABA, inhibici průduchového otevření vlivem světla a narušuje ABA stimulovanou akumulaci  $H_2O_2$ ,  $Ca^{2+}$  a NO ve svěracích buňkách, ale nijak neovlivňuje uzavření průduchů vyvolané exogenní  $H_2O_2$ ,  $Ca^{2+}$  nebo NO. To znamená, že NADK2 pozitivně reguluje signalizaci ABA skrze zvýšení hladin  $H_2O_2$ ,  $Ca^{2+}$  a NO ve svěracích buňkách. NADK2 působí společně s OST1 a ABI1 (angl. ABA insensitive 1) a je pozitivním regulátorem ABA vyvolaného průduchového uzávěru (Sun *et al.*, 2017).

### 2.3.8.2 Oxid dusnatý

NO je všudypřítomná signální molekula, která patří mezi druhé posly účastnící se různých fyziologických procesů. Ty zahrnují stárnutí rostlin a uzavření průduchů při nedostatku vody

(García-Mata and Lamattina, 2001). Účastní se mnoha signalizačních drah rostlinných hormonů, jako je kyselina salicylová, ABA a cytokininy.

V rostlinách se NO syntetizuje ve svěracích buňkách oxidačním nebo redukčním mechanismem pomocí syntázy oxidu dusnatého (NOS) a nitrátreduktázy (Bright *et al.*, 2006). Nitrátreduktázy NIA1 a NIA2 určují produkci NO v rostlinách a jsou důležité pro zavření průduchů vyvolaného ABA. Důležitost nitrátreduktáz pro průduchové pohyby byla zkoumána u mutantů *nia1nia2*. U nich nedocházelo k zesílení S-typu aniontových kanálů prostřednictvím ABA a k inhibici  $K^+$  kanálů vyvolané ABA, které slouží pro vtok  $K^+$  do svěracích buněk (Zhao *et al.*, 2016).

Interakce NO - ABA má jak pozitivní, tak i negativní účinky během stresových reakcí (Fancy *et al.*, 2017). NO podporuje uzavření průduchu, což naznačuje jeho pozitivní roli v signalizaci ABA. Na druhé straně endogenní NO funguje jako negativní regulátor signalizace ABA ve svěracích buňkách (Wang *et al.*, 2015). Negativní účinky NO byly zkoumány u trojitého mutantu *nia1nia2noa1-2*, který při nedostatečné výrobě NO byl přecitlivělý na uzavření průduchů vyvolané ABA. U mutantů docházelo k zlepšení tolerance vůči suchu (Lozano-Juste and Leon, 2010).

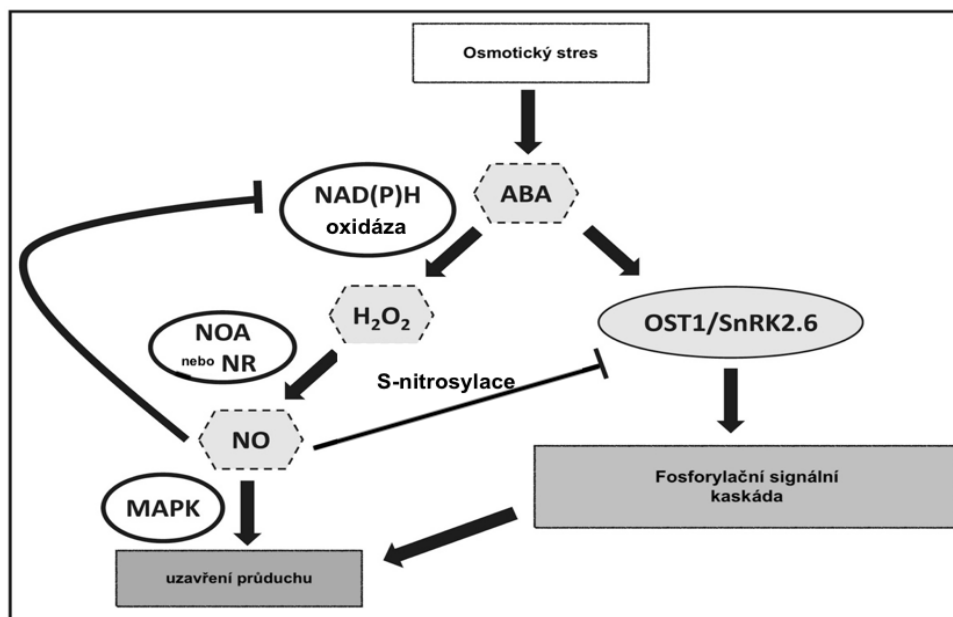
Negativní regulace signalizace ABA působením NO při zavření průduchů začíná ve svěracích buňkách tím, že NO vyvolává S-nitrosylaci řady regulačních proteinů, které jsou součástí ABA odezvy na osmotický stres. Ty zahrnují jak proteinkinázy, tak transkripční faktory. Donor NO, S-nitrosoglutathion (GSNO) vyvolává S-nitrosylaci OST1 a tím inhibuje její aktivitu (Lang and Zuo, 2015). S-nitrosylace je způsobena u SnRK2.6 na cysteinovém zbytku 137 blízko katalytického místa kináz a blokuje aktivitu kinázy, proto u mutantů *Cys137Ser* dochází k zabránění inhibice aktivity OST1 kinázy pomocí GSNO. Mutanti *gsnor1-3* mají nefunkční gen pro GSNO reductázu (GSNOR), což vede k vyšší úrovni endogenní S-nitrosylace, způsobuje překročení koncentrace NO ve svěracích buňkách a necitlivost průduchů na kyselinu abscisovou při regulaci průduchových pohybů. U mutantů dochází k větší ztrátě vody než u WT (Wang *et al.*, 2015). Nejenom SnRK2.6, ale také SnRK2.2 a SnRK2.3 mohou být inaktivovány pomocí GSNO skrze S-nitrosylaci, a tím je blokována ABA signalizace (Wang *et al.*, 2015).

NO sice působí proti signalizaci ABA, která vede k uzavření průduchů během osmotického stresu, ale přesto vyvolá uzavření tím, že stimuluje aktivitu MAPK, syntézu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), cADPR a reguluje koncentraci  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Cl^-$  v cytoplazmě svěracích buněk (García-Mata *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007). CADPR a cGMP patří mezi druhé posly, které indukuje ABA, sloužící k zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě svěracích



buněk. cGMP je důležitá součást uzavření průduchů regulovaného ABA. Působí v signální cestě po směru signalizace  $H_2O_2$  a NO, které vyvolávají rychlé a dramatické zvýšení koncentrace cGMP, ale před zvýšením koncentrace  $Ca^{2+}$  v signální cestě ABA. Zvýšená koncentrace  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě svěřacích buněk vyvolaná  $H_2O_2$  a NO je závislá na cGMP a inhibice syntézy cGMP silně potlačuje průduchové uzavření vyvolané  $H_2O_2$  (Dubovskaya *et al.*, 2011).

Také u uzavření průduchů regulovaného NO dochází k negativní regulaci kanálu  $K^+$  sloužící pro vtok  $K^+$  do cytoplazmy svěřacích buněk nebo těsně asociovaného regulačního proteinu, zatímco pozitivně reguluje aniontové kanály. NO aktivuje  $Cl^-$  kanály a kanály pro výtoku  $K^+$  ze svěřacích buněk zvyšováním koncentrace  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě svěřacích buněk (Garcia-Mata *et al.*, 2003). To vše vede k výtoku vody ze svěřacích buněk a uzavření průduchu.



Obr. 3: Model znázorňující dvě možnosti uzavření průduchů pomocí ABA během osmotického stresu, které jsou popsány v této práci. Na jedné straně pomocí sekundárních posílů a na druhé straně uzavírá průduchy pomocí fosforylační kaskády. (upraveno a převzato (Fancy, Bahlmann and Loake, 2017))

### 2.3.8.3 Lipidy

ABA vyvolává také produkci druhých posílů odvozených od lipidů. Rostliny při stresu často produkují lipidové signalizační molekuly, kterých je méně než strukturních lipidů (Hou *et al.*, 2016). Několik z těchto lipidů mezi sebou interagují a má vliv na uzavření průduchů.

Například nadměrná produkce fosfolipázy C (PLC) zlepšuje odolnost rostliny proti suchu (Tripathy *et al.*, 2012). Také hexafosfát (IP6) vylepšuje toleranci rostliny vůči suchu a to tím, že uvolňuje  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob, které poté inhibují  $\text{K}^+$  kanály směřující do cytoplazmy svěřacích buněk. ABA spouští reakce závislé na IP6 a ty patří k jedněm z nejrychlejších (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000).

Hlavní fosfolipázy D (PLD), které jsou aktivovány během signalizace ABA jsou PLD $\alpha$ 1 a PLD $\delta$ , souvisí s regulací uzavření průduchů zprostředkovaného pomocí NO (Sang *et al.*, 2001). PLD $\delta$  je hlavní fosfolipázou zodpovědnou za produkci PA, která je stimulovaná  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Obě tyto fosfolipázy jsou zapotřebí pro uzavření průduchů vyvolané NO,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ABA. Mutanti *pld $\alpha$ 1* nejsou schopni produkovat ROS ve svěřacích buňkách během působení ABA, protože PLD $\alpha$ 1 i PA jsou potřeba k produkci ROS. Z toho vyplývá, že jsou důležitými regulátory cytoplazmatické membránové aktivity NADPH oxidázy v odezvě na ABA při uzavření průduchů. PA reguluje aktivitu NADPH oxidázy tím, že se váže na RbohD nebo RbohF. Přerušением vazby PA-RbohF (nebo RbohD) dochází k ohrožení uzavření průduchů a produkce ROS, kterou zprostředkovává ABA. Mutanti *pld $\delta$*  nedokáží uzavřít průduchy zprostředkované NO, ale přesto mutant dokáže s využitím PA uzavřít průduchy, pomocí depolymerizace mikrotubulů vedoucích k inhibici  $\text{H}^+$ -ATPázy a  $\text{K}^+$  kanálů, které pumpují  $\text{K}^+$  směrem do cytoplazmy svěřacích buněk (Distéfano *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009).

S PA a PLD interagují fyto-sfingosin-1-fosfát (fyto-S1P) a sfingosin-1-fosfát (S1P), které mají důležitou roli v uzavření průduchů vyvolaném ABA. ABA podporuje zvýšení hladiny sfingosinkinázy (SPHK), která vede k tvorbě fyto-S1P. Ten aktivuje PLD $\alpha$ 1 produkující PA, která se přímo váže na SPHK a zvyšuje její aktivitu produkující fyto-S1P (Guo *et al.*, 2012). Tato signální kaskáda vede k uzavření průduchů, které je vyvoláno spolu s výrazným vzestupem koncentrace NO a cytoplazmatického pH svěřacích buněk. Produkce NO vyvolaná fyto-S1P/S1P je tedy spojena s PLD, nezávisle na PA. Fyto-S1P indukované uzavření průduchů zprostředkované NO nastává prostřednictvím zvýšením koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  svěřacích buněk. Také může nastávat uzavření průduchů, které je indukované fyto-S1P a závislé na pH. Takovéhle uzavření je zprostředkováno prostřednictvím aktivace  $\text{K}^+$  kanálů sloužících pro výtok draslíku z cytoplazmy svěřacích buněk (Puli *et al.*, 2016).

## 2.4 Pasivní uzavírání průduchů

Pasivní hydraulické uzavření průduchu je řízeno přímo hydratací listů a vodním potenciálem. Při snížení vodního potenciálu v blízkosti svěřacích buněk dojde k zmenšení tlaku turgoru svěřacích buněk a uzavření průduchu. Zvyšování VPD přispívá ke zvýšené transpiraci skrze průduchy, která je řízena difúzí. Svěřací buňky regulují vodivost průduchů ( $g_s$ ), která je definovaná jako rychlost transpirace dělená VPD. Průduchy se tudíž pasivně uzavírají během vysokého VPD a při vysokých hodnotách  $g_s$  a to proto, aby se zabránilo nadměrným ztrátám vody (Merilo *et al.*, 2018; Pantin and Blatt, 2018).

Úloha ABA během pasivního uzavření průduchů byla studovaná u *aba* mutantů, kteří reagují na VPD, například byla zkoumána *Arabidopsis thaliana* nesoucí mutace v různých krocích biosyntézy ABA. Všechny ABA-deficientní rostliny uzavírají průduchy rychle a extenzivně v odezvě na vysokou VPD. Také ABA necitliví mutanti, kteří mají vady u receptorů PYR/PCAR, reagují na změny VPD. Z toho vyplývá, že VPD vyvolaný uzavěr průduchu může být hydraulický (pasivní) (McAdam and Brodribb, 2015).

V evoluci rostlin se nejdříve průduchové pohyby regulovaly pomocí pasivního (hydraulického) mechanismu, které nevyužívalo kyselinu abscisovou. Přejít z pasivního na aktivní regulaci průduchových pohybů se objevuje již brzy v evoluci. V současné době se pasivní uzavření průduchů vyskytuje u kapradin, plavuní a nahosemenných rostlin (McAdam and Brodribb, 2015). Existuje mezilehlý typ průduchového uzavření mezi pasivním a aktivním uzavřením, které bylo pozorováno například u jehličnanu *Metasequoia glyptostroboides*. Pokud rostlina není vystavena silnému osmotickému stresu, tak průduchy využívají pasivní hydraulické uzavření v reakci na změny vlhkosti ovzduší a obsahu vody v půdě. Uzavření průduchů pomocí ABA se stává dominantní až po delším působení osmotického stresu tehdy, když se rostliny přibližují ke škodlivé hodnotě vodního potenciálu a mohlo by dojít k poškození hydraulického systému (McAdam and Brodribb, 2014). Také u některých krytosemenných rostlin může pasivní hydraulické uzavření průduchů převažovat nad aktivním v časných fázích osmotického stresu (Tombesi *et al.*, 2015).

### 3. Závěr

Tolerance rostlin k nedostatku vody je stále aktuálnější a atraktivnější téma pro výzkum, proto se v této bakalářské práci zabývám fyziologickou tolerancí rostlin na osmotický stres a to regulací průduchových pohybů. Významnou roli při uzavření průduchů během působení osmotického stresu má ABA, ale i mnoho další signálních molekul. Přesto, že o vzájemné interakci mezi signálními molekulami víme hodně, stále dochází k výrazným pokrokům v tomto odvětví. Cílem této práce bylo popsat signální kaskádu vedoucí k uzavření průduchů, která je vyvolaná aktivně pomocí ABA a krátce se zmínit o pasivním uzavření průduchů. Byly popsány dvě cesty zahrnující působení kyseliny abscisové vedoucí k uzavření průduchů.

První možný způsob uzavření průduchů prostřednictvím ABA začíná pomocí signální dráhy, která vede k fosforylaci cílových proteinů nacházejících se v jádře a na cytoplazmatické membráně svěřacích buněk. Během uzavření průduchů ABA zvyšuje koncentraci cytoplazmatických  $\text{Ca}^{2+}$  ve svěřacích buňkách vedoucí k inhibici  $\text{H}^+$ -ATPázy a aktivují se aniontové kanály R-typu a S-typu, které vyvolávají aniontový výtok. Tyto změny vyvolávají depolarizaci cytoplazmatické membrány, která vede k výtoku  $\text{K}^+$  z cytoplazmy svěřacích buněk. Také dochází k inhibici kanálů pro vtok  $\text{K}^+$  do cytoplazmy svěřacích buněk. Během výtoku aniontů a  $\text{K}^+$  dochází k odtoku vody, který vede k zmenšení turgoru a uzavření průduchu.

Druhý způsob uzavření průduchů vyvolaného ABA souvisí s produkcí sekundárních posílů, a to hlavně  $\text{H}_2\text{O}_2$  a NO. Zvyšující se koncentrace peroxidu vodíku, která je vyvolaná kyselinou abscisovou vede k syntéze oxidu dusnatého. NO sice působí proti signalizaci ABA vedoucí k uzavření průduchů, a to S-nitrosylací SnRK2, ale bylo zjištěno, že NO přesto průduch uzavře. NO stimuluje aktivitu MAPK, syntézu cADPR a cGMP. Během uzavření průduchů vyvolaného NO dochází v cytoplazmě svěřacích buněk k zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a snížení koncentrace  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$ .

Průduchy se v neposlední řadě mohou uzavírat pasivně bez působení ABA. Pasivní uzavření nastává tak, že při vysokém VPD roste transpirace rostliny, a to vede k poklesu turgoru a uzavření průduchu. Hydraulické uzavření se v současné době vyskytuje u kapradin, nahosemenných rostlin, plavuní a u některých krytosemenných rostlin v časných fázích působení osmotického stresu.

## Seznam literatury

- Acharya, B. R. and Assmann, S. M. (2009)** ‘Hormone interactions in stomatal function’, *Plant Molecular Biology*, 69(4), pp. 451–462.
- Ache, P. et al. (2000)** ‘GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel’, *FEBS Letters*, 486(2), pp. 93–98.
- Aldea, M. et al. (2006)** ‘Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings’, *Oecologia*, 149(2), pp. 221–232.
- Allaway, W. G. (1973)** ‘Accumulation of malate in guard cells of *Vicia faba* during stomatal opening’, *Planta*, 110(1), pp. 63–70.
- Brandt, B. et al. (2012)** ‘Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), pp. 10593–10598.
- Boussiba, S., Rikin, A. and Richmond, A. E. (1975)** ‘The Role of Abscisic Acid in Cross-Adaptation of Tobacco Plants’, *Plant Physiology*, 56(2), pp. 337–339.
- Brandt, B. et al. (2015)** ‘Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells’, *eLife*, 4, pp. 1–25.
- Bright, J. et al. (2006)** ‘ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis.’, *The Plant Journal*, 45(1), pp. 113–122.
- Dalgleish, T. et al. (2014)** *Handbook chemical and biological plant analytical methods*, Chapter: 4.
- Danquah, A. et al. (2015)** ‘Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*’, *The Plant Journal*, 82(2), pp. 232–244.
- Daszkowska-golec, A. (2016)** *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2*. Edited by M. A. Hossain et al., Springer International Publishing.
- Daszkowska-Golec, A. and Szarejko, I. (2013)** ‘Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions’, *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Distéfano, A. M. et al. (2012)** ‘Phospholipase Dδ is involved in nitric oxide-induced stomatal closure’, *Planta*, 236(6), pp. 1899–1907.
- Doi, M., Kitagawa, Y. and Shimazaki, K. (2015)** ‘Stomatal Blue Light Response Is Present in Early Vascular Plants’, *Plant Physiology*, 169(2), pp. 1205–1213.

- Drake, P. L., Froend, R. H. and Franks, P. J. (2013)** ‘Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance’, *Journal of Experimental Botany*, 64(2), pp. 495–505.
- Dubovskaya, L. V et al. (2011)** ‘cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive Arabidopsis mutant *abi1-1*’, *New Phytologist*, 191(1), pp. 57–69.
- Edwards, D., Davies, K. L. and Axe, L. (1992)** ‘A vascular conducting strand in the early land plant *Cooksonia*’, *Nature*, 357(6380), pp. 683–685.
- Edwards, D., Fanning, U. and Richardson, J. B. (1986)** ‘Stomata and sterome in early land plants’, *Nature*, 323(6087), pp. 438–440.
- El-Maarouf-Bouteah, H. et al. (2015)** ‘Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination’, *Plant, Cell & Environment*, 38(2), pp. 364–374.
- Fancy, N. N., Bahlmann, A. K. and Loake, G. J. (2017)** ‘Nitric oxide function in plant abiotic stress’, *Plant Cell & Environment*, 40(4), pp. 462–472.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003)** ‘Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria’, *Physiologia Plantarum*, 119(3), pp. 355–364.
- Franks, P. J. and Britton-Harper, Z. J. (2016)** ‘No evidence of general CO<sub>2</sub> insensitivity in ferns: one stomatal control mechanism for all land plants?’, *New phytologist*, 211(3), pp. 819–827.
- Freundl, E., Steudle, E. and Hartung, W. (2000)** ‘Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis’, *Planta*, 210(2), pp. 222–231.
- Fujita, Y. et al. (2005)** ‘AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis’, *The Plant Cell*, 17(12), pp. 3470–3488.
- Fujita, Y. et al. (2009)** ‘Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis’, *Plant and Cell Physiology*, 50(12), pp. 2123–2132.
- Garcia-Mata, C. et al. (2003)** ‘Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), pp. 11116–11121.
- García-Mata, C. and Lamattina, L. (2001)** ‘Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress’, *Plant Physiology*, 126(3), pp. 1196–1204.

- Geiger, D. et al. (2010)** ‘Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), pp. 8023-8028.
- Gonugunta, V. K., Srivastava, N. and Raghavendra, A. S. (2009)** ‘Cytosolic alkalinization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan’, *Plant Signaling & Behavior*, 4(6), pp. 561–564.
- Guo, L. et al. (2012)** ‘Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), pp. 8286–8296.
- Gudesblat, G. E., Iusem, N. D. and Morris, P. C. (2007)** ‘Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide’, *New Phytologist*, 173(4), pp. 713–721.
- Hartung, W. et al. (1996)** ‘Abscisic acid in soils: What is its function and which factors and mechanisms influence its concentration?’, *Plant and Soil*, 184(1), pp. 105-110
- Hartung, W., Sauter, A. and Hose, E. (2002)** ‘Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to?’, *Journal of Experimental Botany*, 53(366), pp. 27–32.
- Higgins, C. F. and Linton, K. J. (2004)** ‘The ATP switch model for ABC transporters’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), pp. 918–926.
- Hirayama, T. and Shinozaki, K. (2010)** ‘Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future’, *The Plant Journal*, 61(6), pp. 1041–1052.
- Holland, I. B. et al. (2003)** *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. Elsevier Science.
- Hosy, E. et al. (2003)** ‘The Arabidopsis outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), pp. 5549–5554.
- Hou, Q., Ufer, G. and Bartels, D. (2016)** ‘Lipid signalling in plant responses to abiotic stress’, *Plant, Cell & Environment*, 39(5), pp. 1029–1048.
- Hua, D. et al. (2012)** ‘A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in Arabidopsis’, *The Plant Cell*, 24(6), pp. 2546–2561.
- Hubbard, K. E. et al. (2010)** ‘Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions’, *Genes & Development*, 24(16), pp. 1695–1708.

- Humble, G. D. and Raschke, K. (1971)** ‘Stomatal opening quantitatively related to potassium transport: evidence from electron probe analysis’, *Plant Physiology*, 48(4), pp. 447–453.
- Chaumont, F. and Tyerman, S. (2017)** *Plant Aquaporins: From transport to signalling*. Springer International Publishing (Signaling and Communication in Plants).
- Chiba, Y. et al. (2015)** ‘Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones’, *Journal of Plant Research*, 128(4), pp. 679–686.
- Ishibashi, Y. et al. (2011)** ‘Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants’, *Journal of Plant Physiology*, 168(13), pp. 1562–1567.
- Jalakas, P. et al. (2018)** ‘ABA-mediated regulation of stomatal density is OST1-independent’, *Plant Direct*, 2(9), p. e00082.
- Jeschke, W. D. et al. (1997)** ‘Transport, synthesis and catabolism of (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity’, *Journal of Experimental Botany*, 48(314), pp. 1737–1747.
- Jin, Z. et al. (2017)** ‘Hydrogen sulfide mediates ion fluxes inducing stomatal closure in response to drought stress in *Arabidopsis thaliana*’, *Plant and Soil*, 419(1–2), pp. 141–152.
- Jones, H. G. (1998)** ‘Stomatal control of photosynthesis and transpiration’, *Journal of Experimental Botany*, 49, pp. 387–398.
- Kang, J. et al. (2010)** ‘PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), pp. 2355–2360.
- Kanno, Y. et al. (2012)** ‘Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), pp. 9653–9658.
- Kinoshita, T., Nishimura, M. and Shimazaki, K. (1995)** ‘Cytosolic Concentration of  $Ca^{2+}$  Regulates the Plasma Membrane  $H^+$ -ATPase in Guard Cells of Fava Bean’, *The Plant Cell*, 7(8), pp. 1333.
- Kinoshita, T. et al. (2001)** ‘phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening’, *Nature*, 414(6864), pp. 656–660.
- Koo, H. et al. (2011)** ‘An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), pp.12354-12359.



- Kuromori, T. et al. (2010)** ‘ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), pp. 2361–2366.
- Kwak, J. M. (2003)** ‘NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis’, *The EMBO Journal*, 22(11), pp. 2623–2633.
- Lang, Z. and Zuo, J. (2015)** ‘Say “NO” to ABA signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1’, *Science China Life Sciences*, 58(3), pp. 313–314.
- Larcher, W. (1987)** ‘Streß bei Pflanzen’, *Naturwissenschaften*, 74(4), pp. 158–167.
- Larosa, P. C. et al. (1985)** ‘Abscisic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells to salt’, *Plant Physiology*, 79(1), pp. 138–142.
- Leckie, C. P. et al. (1998)** ‘Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), pp. 15837–15842.
- Lee, K. H. et al. (2006)** ‘Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid’, *Cell*, 126(6), pp. 1109–1120.
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E. A. C. and Brearley, C. A. (2000)** ‘Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K<sup>+</sup>-inward rectifying conductance in guard cells’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), pp. 8687–8692.
- León, J. et al. (2014)** ‘Diverse functional interactions between nitric oxide and abscisic acid in plant development and responses to stress’, *Journal of Experimental Botany*, 65(4), pp. 907–921.
- Li, C.-L. et al. (2016)** ‘THI1, a Thiamine Thiazole Synthase, Interacts with Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase CPK33 and Modulates the S-Type Anion Channels and Stomatal Closure in Arabidopsis’, *Plant Physiology*, 170(2), pp. 1090–1104.
- Li, Y. et al. (2017)** ‘Arabidopsis MAPKKK18 positively regulates drought stress resistance via downstream MAPKK3’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(2), pp. 292–297.
- Lichtenthaler, H. K. (1998)** ‘The Stress Concept in Plants: An Introduction’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, pp. 187–198.
- Linder, B. and Raschke, K. (1992)** ‘A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing’, *FEBS Letters*, 313(1), pp. 27–30.

- Lozano-Juste, J. and Leon, J. (2010)** ‘Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noal-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis*’, *Plant Physiology*, 152(2), pp. 891–903.
- MacRobbie, E. A. C. (2000)** ‘ABA activates multiple  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar  $\text{K}^+(\text{Rb}^+)$  release’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), pp. 12361–12368.
- MacRobbie, E. A. C. (2006)** ‘Control of volume and turgor in stomatal guard cells’, *Journal of Membrane Biology*, 210(2), pp.131-142.
- McAdam, S. A. M. and Brodribb, T. J. (2014)** ‘Separating Active and Passive Influences on Stomatal Control of Transpiration’, *Plant Physiology*, 164(4), pp. 1578–1586.
- McAdam, S. A. M. and Brodribb, T. J. (2015)** ‘The Evolution of Mechanisms Driving the Stomatal Response to Vapor Pressure Deficit’, *Plant Physiology*, 167(3), pp. 833–843.
- McAinsh, M. R. et al. (1996)** ‘Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress’, *Plant Physiology*, 111(4), pp. 1031–1042.
- Merilo, E. et al. (2018)** ‘Stomatal VPD Response: There Is More to the Story Than ABA’, *Plant Physiology*, 176(1), pp. 851–864.
- Meyer, S. et al. (2010)** ‘AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells’, *The Plant Journal*, 63(6), pp. 1054-1062.
- Mitula, F. et al. (2015)** ‘*Arabidopsis* ABA-Activated Kinase MAPKKK18 is Regulated by Protein Phosphatase 2C ABI1 and the Ubiquitin–Proteasome Pathway’, *Plant and Cell Physiology*, 56(12), pp. 2351–2367.
- Mori, I. C. et al. (2006)** ‘CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and  $\text{Ca}^{2+}$ - permeable channels and stomatal closure’, *PLoS Biology*, 4(10), pp. e327.
- Nonami, H., Schulze, E. D. and Ziegler, H. (1991)** ‘Mechanisms of stomatal movement in response to air humidity, irradiance and xylem water potential’, *Planta*, 183(1), pp. 57-64.
- Luan, S. (2002)** ‘Signalling drought in guard cells’, *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 229–237.
- Osakabe, Y. et al. (2014)** ‘ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity’, *New Phytologist*, 202(1), pp. 35–49.
- Pantin, F. and Blatt, M. R. (2018)** ‘Stomatal Response to Humidity: Blurring the Boundary between Active and Passive Movement’, *Plant Physiology*, 176(1), pp. 485–488.

- Pareek, A., Sopory, S. K., & Bohnert, H. J. (2010).** *Abiotic stress adaptation in plants.* Springer Netherlands.
- Park, S. S.-Y. et al. (2009)** ‘Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins’, *Science*, 324(5930), pp. 1068–1069.
- Pilot, G. et al. (2001)** ‘Guard Cell Inward K<sup>+</sup> Channel Activity in Arabidopsis Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), pp. 3215–3221.
- Prabhakar, M. (2004)** ‘Structure , Delimitation , Nomenclature and Classification of Stomata’, *Acta Botanica Sinica*, 46(2), pp. 242–252.
- Prantl, K. (1872)** ‘Die Ergebnisse der neueren Untersuchungen über die Spaltöffnungen’, *Flora*, 55(20), pp. 305.
- Puli, M. R. et al. (2016)** ‘Stomatal closure induced by phytosphingosine-1-phosphate and sphingosine-1-phosphate depends on nitric oxide and pH of guard cells in *Pisum sativum*’, *Planta*. Springer Berlin Heidelberg, 244(4), pp. 831–841.
- Qian, D. et al. (2018)** ‘Arabidopsis ADF5 promotes stomatal closure by regulating actin cytoskeleton remodeling in response to ABA and drought stress’, *Journal of Experimental Botany*, 70(2), pp. 435–446.
- Roelfsema, M. R. G., Levchenko, V. and Hedrich, R. (2004)** ‘ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels’, *The Plant Journal*, 37(4), pp. 578–588.
- Ronzier, E. et al. (2014)** ‘CPK13, a noncanonical Ca<sup>2+</sup> -dependent protein kinase, specifically inhibits KAT2 and KAT1 shaker K<sup>+</sup> channels and reduces stomatal opening’, *Plant Physiology*, 166(1), pp. 314–326.
- Lisar, S. Y. et al. (2012)** ‘Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses’, *Water Stress*.
- Salomon, M. V. et al. (2014)** ‘Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine’, *Physiologia Plantarum*, 151(4), pp. 359–374.
- Sang, Y. et al. (2001)** ‘Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D $\alpha$ ’, *The Plant Journal*, 28(2), pp. 135–144.
- Sato, A. et al. (2009)** ‘Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase’, *Biochemical Journal*, 424(3), pp. 439–448.

- Sauter, A., Dietz, K. J. and Hartung, W. (2002)** ‘A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling’, *Plant, Cell & Environment*, 25(2), pp. 223-228.
- Schroeder, J. I., Kwak, J. M. and Allen, G. J. (2001)** ‘Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants’, *Nature*, 410(6826), pp. 327–330.
- Simpson, M. G. (2006)** *Plant Systematics*. Elsevier Science.
- Sirichandra, C. et al. (2009)** ‘Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase’, *FEBS Letters*, 583(18), pp. 2982–2986.
- Soon, F.-F. et al. (2012)** ‘Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases’, *Science*, 335(6064), pp. 85–88.
- Sun, L. et al. (2017)** ‘NADK2 positively modulates abscisic acid-induced stomatal closure by affecting accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup> and nitric oxide in Arabidopsis guard cells’, *Plant Science*, 262, pp. 81–90.
- Tan, J. et al. (2008)** ‘Effects of Exogenous Nitric Oxide on Photosynthesis, Antioxidant Capacity and Proline Accumulation in Wheat Seedlings Subjected to Osmotic Stress’, *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), pp. 307-313
- Tombesi, S. et al. (2015)** ‘Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine’, *Scientific Reports*, 5(1), p. 12449.
- Tripathy, M. K. et al. (2012)** ‘Characterization and Functional Validation of Tobacco PLC Delta for Abiotic Stress Tolerance’, *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(2), pp. 488–497.
- Trivedi, D. K., Gill, S. S. and Tuteja, N. (2016)** ‘Abscisic Acid (ABA): Biosynthesis, Regulation, and Role in Abiotic Stress Tolerance’, *Abiotic Stress Response in Plants*, pp. 315–326.
- Vahisalu, T. et al. (2008)** ‘SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling’, *Nature*, 452(7186), pp. 487–491.
- Wang, P. et al. (2015)** ‘Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), pp. 613–618.
- Wang, P., Zhu, J. K. and Lang, Z. (2015)** ‘Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins’, *Plant Signaling & Behavior*, 10(6), pp. e1031939.

- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003)** ‘Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance’, *Planta*, 218(1), pp.1–14.
- Wang, X. et al. (2019)** ‘ABRE-BINDING FACTORS play a role in the feedback regulation of ABA signaling by mediating rapid ABA induction of ABA co-receptor genes’, *New Phytologist*, 221(1), pp. 341–355.
- Wang, Y.-F. et al. (2016)** ‘S-type Anion Channels SLAC1 and SLAH3 Function as Essential Negative Regulators of Inward K<sup>+</sup> Channels and Stomatal Opening in Arabidopsis’, *The Plant Cell*, 28(4), pp. 949-965.
- Wells, C. L. and Pigliucci, M. (2000)** ‘Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants’, *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3(1), pp. 1–18.
- Wille, A. C. and Lucas, W. J. (1984)** ‘Ultrastructural and histochemical studies on guard cells’, *Planta*, 160(2), pp. 129-142.
- Willmer, C. and Fricker, M. (1996)** *Stomata*. Springer Science & Business Media.
- Wise, R. R. and Hooper, J. K. (2006)** *The Structure and Function of Plastids (23)*. Kluwer Academic Publishers.
- Xie, Y. et al. (2014)** ‘Reactive Oxygen Species-Dependent Nitric Oxide Production Contributes to Hydrogen-Promoted Stomatal Closure in Arabidopsis’, *Plant Physiology*, 165(2), pp. 759–773.
- Xing, Y., Jia, W. and Zhang, J. (2008)** ‘AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis’, *The Plant Journal*, 54(3), pp. 440–451.
- Xu, Z. et al. (2012)** ‘A Vacuolar  $\beta$ -Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscisic Acid Hydrolyzing Activity Plays an Important Role in Osmotic Stress Responses in Arabidopsis’, *The Plant Cell*, 24(5), pp. 2184–2199.
- Yao, Y. et al. (2013)** ‘Drought-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in subsidiary cells is involved in regulatory signaling of stomatal closure in maize leaves’, *Planta*, 238(1), pp. 217–227.
- Yoshida, T. et al. (2010)** ‘AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation’, *The Plant Journal*, 61(4), pp. 672–685.
- You, J. and Chan, Z. (2015)** ‘ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants’, *Frontiers in Plant Science*, 6.

- Zeiger, E., Farquhar, G. D. and Cowan, I. R. (1987)** *Stomatal Function*. Stanford University Press.
- Zhang, A. et al. (2006)** ‘Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Abscisic Acid-Induced Antioxidant Defense and Acts Downstream of Reactive Oxygen Species Production in Leaves of Maize Plants’, *Plant Physiology*, 141(2), pp. 475–487.
- Zhang, A. et al. (2007)** ‘Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves’, *New Phytologist*, 175(1), pp. 36-50.
- Zhang, H. et al. (2014)** ‘A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in Arabidopsis’, *Molecular Plant*, 7(10), pp. 1522–1532.
- Zhang, X. et al. (2001)**. ‘Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure’, *Cell Research*, 11(1), 37–43.
- Zhang, X. et al. (2001)** ‘K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells’, *Cell Research*, 11(3), pp. 195-202
- Zhang, Y. et al. (2009)** ‘Phospholipase D $\alpha$ 1 and Phosphatidic Acid Regulate NADPH Oxidase Activity and Production of Reactive Oxygen Species in ABA-Mediated Stomatal Closure in Arabidopsis’, *The Plant Cell*, 21(8), pp. 2357–2377.
- Zhao, C. et al. (2016)** ‘Loss of nitrate reductases NIA1 and NIA2 impairs stomatal closure by altering genes of core ABA signaling components in Arabidopsis’, *Plant Signaling & Behavior*, 11(6), pp. e1183088.
- Zou, J.-J. et al. (2010)** ‘Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase CPK10 Functions in Abscisic Acid- and Ca<sup>2+</sup>-Mediated Stomatal Regulation in Response to Drought Stress’, *Plant Physiology*, 154(3), pp. 1232–1243.
- Zou, J.J. et al. (2015)** ‘Arabidopsis CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 Function in Abscisic Acid-Mediated Signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Homeostasis in Stomatal Guard Cells under Drought Stress’, *The Plant Cell*, 27(5), pp. 1445–1460.