

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



ÚLOHA CYTOSKELETU A FOSFOLIPIDŮ V SIGNALIZACI OBRANNÝCH REAKCÍ ROSTLIN

Disertační práce

Školitelka: Doc. RNDr. Jiřina Dušková, CSc.

Školitelka specialistka: Prof. RNDr. Olga Valentová, CSc.

Školitelka specialistka: Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

Praha, 2014

PharmDr Jindřiška Matoušková

Poděkování

Děkuji své školitelce, paní docentce RNDr. Jiřině Duškové, CSc. za podporu, cenné rady a velmi milý přístup, kterého se mi od ní dostalo v celém průběhu studia.

Děkuji školitelkám – specialistkám: paní profesorce RNDr. Olze Valentové a paní docentce Ing. Lence Burketové, CSc. za možnost získat mnoho nových informací a dovedností na jejich pracovištích, za cenné rady, pomoc a čas, který mi věnovaly.

Děkuji i panu profesorovi Janu Marcovi, který mi s nadšením vysvětloval jak fungují rostliny i věda, daroval nám materiál k experimentům a mnoho dobrých nápadů a vždy šířil pohodu; je mi velmi líto, že nás předčasně opustil a už nemůžeme dál spolupracovat.

Děkuji RNDr. Janu Petráškoví, PhD., že mi trpělivě a s porozuměním vysvětloval taje cytoskeletu i mikroskopů, vždy mi ochotně pomohl, umožnil mi pracovat na konfokálním mikroskopu a seznámil mě s mnoha úžasnými lidmi, například s RNDr. Kateřinou Schwarzerovou, PhD, které vděčím za mnoho rad a materiálu k experimentování a za možnost naučit se na jejich pracovišti molekulárně biologické přístupy a mnoho dalších, důležitých postupů.

Děkuji Dr. Erice Bellinvia za mnoho praktických rad týkajících se klonování i vědy obecně. Grazie di tutto, sono felice di conoscerti, Erica. Děkuji i všem ostatním z Přírodovědecké fakulty, kteří mi pomohli radou a milým přístupem (Prof.RNDr. Zdeňku Opatrnému, CSc.,RNDr. Janě Krtkové, PhD, RNDr. Evě Husákové, RNDr. Radovanu Fišerovi, PhD. a všem učitelům, kteří mi předávali zkušenosti během mého studia).

Děkuji i všem bývalým spolupracovníkům z ÚEB, bylo to invenční a milé prostředí. Za mnoho rad a zkušeností děkuji i RNDr. Tomáši Moravcovi, PhD., Ing. Kateřině Malínské, PhD, RNDr. Jiřímu Libusovi, PhD., Mgr. Markétě Pařezové a dalším.

Ing. Martinu Jandovi děkuji za příjemnou spolupráci během přípravy článku. Ing. Hance Chmelařové za provedení metabolické analýzy. Ing. Janu Andrejchovi za poskytnutí obrázků č.27, 28, 29,a 31, které nasnímal během své diplomové práce pod mým vedením. Děkuji i Ing. Petru Schimandlovi, Bc. Janě Šťastné a Bc. Renatě Dvořákové, kteří si rádi vyposlechli mé rady, během svého studia a učili mě, dívat se na mnoho problémů vědou neovlivněným a originálním způsobem.

RNDr. Jiřímu Kubáskovi, PhD děkuji za rady a pomoc nejen se statistickým zpracováním dat, za jeho odvalu a také podporu, kterou mi vždy vyjadřoval.

Děkuji Ing. Petru Skůpovi, PhD. za podnětné rozhovory, jeho originální pohled na život a velkou pomoc, kterou mi vždy ochotně nabídl.

Děkuji mým dětem, které byly velmi trpělivé a ukazují mi, co je v životě důležité.

Děkuji své rodině a kamarádům, kteří mě pomohli ve chvílích, kdy to nebylo jednoduché.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Praze 18. 7. 2014

Jindřiška Matoušková

SOUHRN	3
SUMMARY	4
1. ÚVOD	5
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
2.1. Imunitní systém rostlin	7
2.1.1. Rozpoznání patogenu rostlinou.....	7
2.1.2. Úloha efektorů v imunitní odpovědi rostlin	9
2.1.3. Systémově získaná rezistence	10
2.2. Signalizace v obranných reakcích rostlin	12
2.2.1. Signalizace v obranných reakcích proti patogenům.....	12
2.2.2. Signalizace v reakci na abiotický stres.....	16
2.2.3. Fosfolipidová signalizace v obranných reakcích	18
2.3. Subcelulární změny při obranných reakcích	21
2.3.1. Cytoskelet.....	24
2.3.2. Techniky používané při vizualizaci cytoskeletu	32
2.3.3. Látky ovlivňující dynamiku cytoskeletu.....	33
2.4. Produkce sekundárních metabolitů a obrana rostlin	34
2.4.1. Charakteristika <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	34
2.4.2. Sekundární metabolismus <i>Arabidopsis thaliana</i> a jeho zapojení v obraně.....	35
2.4.3. Produkce sekundárních metabolitů explantátovými kulturami <i>in vitro</i>	41
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE:	43
4. MATERIÁL A METODY	44
4.1. Materiál	44
4.1.4. Primery.....	44
4.1.5. Bakteriální kmeny	45
4.1.6. Rostlinný materiál.....	45
4.2. Metody	46
4.2.1. Kultivace a mikroskopie rostlinného materiálu	46
4.2.2. Příprava konstruktu mCherry-TUA6 a mCherry-TUB6	51
4.2.3. Transformace rostlin a buněčných suspenzních kultur	53
4.2.4. Odvození buněčných suspenzních kultur z <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
4.2.5. Extrakce rostlin pro metabolomickou studii	56
4.2.6. Hmotnostní spektrometrie.....	56
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	58
5.1. Změny cytoskeletu v časných stádiích obranné reakce	58
5.1.1. Kyselina salicylová i benzothiadiazol způsobuje rozpad aktinových filament.....	59
5.1.2. Kyselina fosfatidová aplikovaná před kyselinou salicylovou zabrání rozpadu aktinového cytoskeletu	65

5.2. <i>In vivo</i> interakce fosfolipasy Dδ a mikrotubulárního cytoskeletu.....	66
5.2.1. Studium <i>in vivo</i> lokalizace GFP-PLD δ v suspenzních kulturách BY-2 a <i>A. thaliana</i>	68
5.2.2. Transgenní rostliny <i>A.thaliana</i> exprimující mikrotubulární markery pro kolokalizační studie	71
5.2.3. Studium <i>in vivo</i> lokalizace GFP-PLD δ a kolokalizace s mikrotubulárními markery v rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
5.3. Časné změny mikrotubulárního cytoskeletu po působení solného stresu	82
5.4. Ovlivnění metabolomu <i>Arabidopsis thaliana</i> signálními molekulami.....	89
6. ZÁVĚR.....	93
7. POUŽITÉ ZKRATKY.....	94
8. SEZNAM TABULEK	99
9. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	100
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	102

Souhrn

Po působení abiotických nebo biotických stresových faktorů spouští rostliny současně mnoho komplexních signálních dějů, které mohou během několika hodin vyústit v účinnou obranu. Na molekulární úrovni je signalizace postupný sled velmi rychlých biochemických reakcí.

Je velice těžké sledovat během interakce patogenu a rostliny jeden konkrétní signalizační děj od začátku do konce. Signální dráhy jsou vzájemně propojeny a působí, jak synergisticky, tak i antagonisticky, aby mohly jemně vyrovnávat situace, kterým je rostlina vystavena v konkrétní chvíli.

Předložená práce se zaměřuje na několik složek této komplikované signální sítě, především na úlohu kyseliny salicylové, fosfatidové, změn cytoskeletu a jejich vzájemného působení, které v samotném závěru obranné reakce může vyústit ve změnu metabolomu. Mikroskopické zobrazení fluorescenčně značených proteinů v živých pletivech – live imaging – může pomoci odhalit lokalizaci a dynamiku vybraných proteinů během obranné reakce. Při obranné odpovědi probíhá mnoho důležitých dějů v plasmatické membráně: rozpoznání patogenu, endocytosa, exocytosa, přenos iontů a jiných molekul ap. Aktivitou fosfolipas D vzniká v plasmatické membráně kyselina fosfatidová (PA). U jedné z jejích izoform, PLD δ , se předpokládá přímá vazba na cytoskelet. Signální dráha spuštěná PA se podílí přes proteiny vázající se k cytoskeletu na změnách jeho dynamiky.

Tato práce se pokouší popsat lokalizaci PLD δ a její propojení s mikrotubuly těsně pod plasmatickou membránou, především s použitím *in vivo* mikroskopických technik. Expres reportérového genu *GFP-PLD δ* v *Arabidopsis thaliana* odhalilo velice dynamické bodové uspořádání PLD δ , stejně jako zřídka se vyskytující stabilní filamenta, která někdy kopírují dráhy mikrotubulů a pravděpodobně se nacházejí v místě lipidových raftů na plasmatické membráně.

Pozorováním regenerace mikrotubulů v průběhu několika hodin působení solného stresu v rostlinách s vyřazenou PLD δ , byla zjištěna její důležitá úloha při stabilizaci interakce mikrotubulů s plasmatickou membránou, ať už přímo nebo přes další proteiny.

Hmotnostní spektrometrie pomohla zjistit snížené množství sekundárních metabolitů po zablokování funkce PA v buňkách, tím se potvrdilo, že fosfolipidová signalizace ovlivňuje všechny složky obranné reakce.

Kyselina salicylová (SA) je zapojena v signalizaci nastupující jak po biotickém, tak i po abiotickém stresu. Zjistili jsme, že po působení SA dochází k rychlému snižování počtu aktinových vláken, ale i opačnou reakci – zvyšování počtu aktinových filament, jestliže byla předem přidána PA. Tento jev by mohl být vysvětlen nutností správné posloupnosti změn v aktinové dynamice a dalších signálů při obranné reakci. SA nebo krátká, depolymerovaná vlákna aktivují PLD, která přes působení PA aktinová vlákna opět polymeruje. Na základě našich pozorování a dalších publikovaných údajů lze usuzovat, že správně načasované střídání fáze polymerace a depolymerace aktinových vláken by mohlo být nezbytnou podmínkou úspěšně probíhající obranné reakce.

Summary

Upon abiotic and biotic cues, plant surveillance system simultaneously triggers a variety of signaling events to develop an effective defense response within a few hours. On the molecular level, signaling period is the chain of many consecutive and fast biochemical reactions. Tracking of one particular signaling event e.g. during plant-pathogen interactions is quite difficult task.

Presented work is focused on several components of this intricate defense network; namely on the role of salicylic acid, phospholipid signaling and cytoskeleton dynamics and their mutual interaction coupled with downstream changes of plant metabolism.

Live imaging can help to elucidate localization and dynamics of particular, fluorescently labeled proteins during defense response. Plenty of important events occurring in plant-pathogen interactions take place in plasma membrane: where pathogen perception, exocytosis, endocytosis occur and ion channels and carriers are located. Also phosphatidic acid (PA) emerges in plasma membrane by the action of phospholipase D. Phospholipase D δ (PLD δ) is supposed to be directly connected with cytoskeleton. Signaling pathway triggered by second messenger, PA participates in the changes of cytoskeleton dynamics through cytoskeleton binding proteins and interacts with many other pathways, leading to successful defense.

This work tries to address localization of PLD δ beneath plasma membrane and its connection with microtubules employing live imaging methods. Expression of reporter gene *GFP-PLD δ* in *Arabidopsis thaliana*, revealed very dynamic localization of PLD δ on plasma membrane in dot patterns as well as rare, steady filamentous structures, sometimes following trajectory of microtubules and probably occupying sites underneath lipid rafts in plasma membrane. Lipid rafts are well known for their signaling potential. Importance of PLD δ for stabilization of microtubules was revealed by monitoring of microtubules regeneration in plants lacking PLD δ during salt stress. PLD δ stabilizes microtubules on the plasma membrane through direct or indirect link.

Phospholipid signaling obviously influences all levels of defense, 1-butanol eliminates PA from cells and influences downstream reaction during phospholipid signaling leading to the decrease of secondary metabolites production.

Plant hormone salicylic acid (SA) is involved in the course of defense against both biotic and abiotic stresses. Live imaging uncovered rapid decrease of actin filament amount after treatment with salicylic acid, but phosphatidic acid was able to prevent this effect. This phenomenon could be explained by correct succession of changes in actin dynamics or other signals in general during defense response. SA or, short, depolymerized actin filaments could activate PLD which, in turn could cause polymerization of filaments by production of PA during defense response. Based on our results and other published data we can speculate that accurate alternation of depolymerization and polymerization of actin filaments could be necessary for successful defense response of plants.

Na stéblo trávy
vážka sedá a stéblo
jí sednout nedá.
Macuo Bašó

1. Úvod

Podstatou nalézání rovnováhy u živých systémů je komunikace, která se na jakékoliv úrovni uskutečňuje přijímáním a předáváním signálů. Rostliny se zdají tiché a nepohyblivé, ale stejně jako ostatní formy života musejí odolávat podobným vnějším faktorům, přičemž řada z nich působí nepříznivě. Jakou používají strategii, aby našly ztracenou rovnováhu? Možná, že si rostliny během vývoje vytvořily sofistikovanější komunikační síť, která je skrytá uvnitř jejich buněk. Pojďme se na ni podívat...

Každý nepříznivý vnější podnět rostliny nějakým způsobem vnímají a uvnitř jejich buněk se spouští velké množství přesně řízených a načasovaných dějů, které mají vést k nalezení ztracené rovnováhy.

Již tři minuty po tom, co rostlinná buňka detekuje tlak vyvíjený například patogenem na její buněčnou stěnu, začne pod místem tohoto tlaku shromažďovat vlákna cytoskeletu a rozběhne se kaskáda signalizačních dějů. Buňky přesunou jádro i další organely pod místo nebezpečí, dojde k přeprogramování genové exprese a po několika hodinách začnou buňky syntetizovat obranné proteiny, které jim umožní více či méně úspěšně čelit infekci.

Při interakci s patogeny hraje velmi důležitou roli plasmatická membrána a to nejen proto, že na ní jsou umístěny receptory rozpoznávající přítomnost patogenu, jsou tam přítomné i iontové kanály a přenašeče, které se účastní signalizace. Stavební složkou plasmatické membrány jsou fosfolipidy, ty mohou být aktivitou fosfolipas D metabolizovány na kyselinu fosfatidovou, která je u rostlin velmi důležitým druhým poslem a účastní se řady procesů, mezi jinými také modifikace dynamiky cytoskeletu, jehož části se nachází těsně pod plasmatickou membránou a s plasmatickou membránou může být také přímo spojen pomocí fosfolipasy Dδ.

Výzkum změn po působení stresových faktorů, které se často odehrávají jen v malé oblasti buňky po velmi krátkou dobu, vyžadoval použití nových přístupů, které odhalení takových jemných změn dovolí.

Jako velmi užitečná se ukázala kombinace moderních mikroskopických přístupů, které s dostatečnou přesností umožňují zobrazování fúzních, fluorescenčně značených proteinů v reálném čase – live imaging. S pomocí těchto metod jsme sledovali různé způsoby, jakými je fosfolipasa Dδ pod plasmatickou membránou lokalizována a také dynamiku tohoto uspořádání a její propojení se sítí mikrotubulů. Takový postup pomůže určit úlohu fosfolipasy Dδ během signalizačních událostí v buňce. Live imaging a analýza obrazu umožnili sledovat také dynamiku aktinového cytoskeletu, která se výrazně mění v průběhu obranné reakce po působení kyseliny salicylové a pouze přesně řízené a správně proběhlé změny mohou vyústit v účinnou obranu.

Mikroskopické metody aplikované na rostliny, v nichž není funkční gen pro fosfolipasu Dδ pomohly objasnit úlohu fosfolipasy Dδ při stabilizaci mikrotubulů během působení zvýšené koncentrace soli.

S využitím hmotnostní spektrometrie byl sledován vliv inhibice fosfolipidové signalizace a posílení signalizace kyseliny salicylové na tvorbu a množství sekundárních metabolitů, které jsou často produkovány v souvislosti s reakcí rostlin na stres.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Imunitní systém rostlin

Udržení velmi křehké rovnováhy mezi včasnou, přiměřenou a dlouhodobě zapamatovanou reakcí na cizorodé látky a zároveň schopností nepoškozovat svůj vlastní organismus patří k základním vlastnostem dobře fungující imunity, a to jak u rostlin, tak i u živočichů.

U živočichů se imunita dělí na nespecifickou (obecnou, vrozenou, evolučně starší, bazální) a specifickou (adaptivní, získanou, s pamětí). Zatímco u živočichů se pod pojmem nespecifická imunita rozumějí fyzikální a chemické bariéry těla, fagocytóza (a následná produkce cytokinů), funkce přirozených zabíječů (NK buňky – natural killer), funkce komplementových proteinů (atraktanty leukocytů, reakce na antigeny) a obecná místní zánětlivá reakce způsobená funkcí bazofilních leukocytů. Rostlinám chybějí pohyblivé buňky zajišťující imunitní funkce, ale podobně jako živočichové jsou i rostliny schopné rozpoznávat variabilní antigenní struktury receptory umístěnými na povrchu plasmatické membrány i uvnitř buněk a reagovat na ně. Navíc bazální imunita je jedinou známou imunitou, na kterou se mohou rostliny při setkání s patogenem spolehnout.

2.1.1. Rozpoznání patogenu rostlinou

Rostlina pomocí této imunity rozpoznává základní typy povrchových struktur a reaguje na ně odpovědí zvanou PTI (pathogen triggered immunity), dříve nazývanou bazální nebo horizontální rezistence. Rostlina rozpozná specifickou povrchovou antigenní strukturu patogenu (MAMP: microorganism-associated molecular pattern nebo PAMP – pathogen-associated molecular pattern, případně DAMP – damage-associated molecular pattern). Receptory rozpoznávající tyto molekulární vzory (PRRs – pattern recognition receptors) jsou receptorům podobné kinyasy nebo proteiny (RLK – receptor-like kinases, RLP – receptor-like proteins) a v obou případech obsahují LRR domény (leucin-rich repeat), na které se specificky navážou mikrobiální struktury: glykany, lipidy a proteiny, ale zřejmě i struktury pocházející z poškozených rostlinných buněk – endogenní elicitory. O mimořádné užitečnosti LRR vypovídá to, že se u živočichů a rostlin vyvinuly nezávisle, konvergentně a nejsou tedy v genomech jen společně konzervované, jak by se dalo předpokládat. V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno kolem 615 RLK. (Spoel *et al.*, 2012). Přehled popsanych typů PAMP a jejich receptorů je uveden v tabulce 1 (Muthamilarasan *et al.*, 2013). Jeden z nejprozkoumanějších PAMP je N-koncový dvaadvaceti aminokyselinový peptid flagelinu (flg22), který se váže na FLS 2 (flagellin-sensitive 2) receptor-like kinasu, která pak interaguje s další kinasou BAK1/SERK3 (BRI1-associated receptor kinase1/ somatic embryogenesis receptor kinase3). BRI1 (brassinosteroid insensitive1) je receptorem pro rostlinné hormony brassinosteroidy zapojené jak ve vývoji, tak i v odpovědi rostlin na stres. BRI1 se vyskytuje jako monomer a ke spuštění kaskády, která vede k projevům funkce brassinosteroidů je zapotřebí, aby receptor nejen dimerizoval, ale spojil se i s BAK1/SERK3. Po navázání tohoto komplexu k FLS2 se zřejmě dále upravuje směr,

kterým se odpověď na brassinosteroidy ubírá. V tomto případě to může být například přes transkripční faktor MYB 30, který pozitivně reguluje rozvoj hypersenzitivní reakce. Zároveň jsou některé proteiny (SIZ1 – E3 SUMO ligasa) ovlivňované MYB30 zapojeny v dráze ABA a způsobují snížení senzitivity rostliny k ABA. Pokusila jsem se zde popsat jen velmi nepatrnou výšeč rostlinné odpovědi na flg22 a mnoho zapojených molekul ve výčtu chybí, protože by byl popis velmi nepřehledný a nebo nejsou molekuly ještě známy. Takových reakcí probíhá v rostlině po percepci PAMP velké množství, signální dráhy se různě propojují a jemně modulují výslednou odpověď, která sestává z velkého množství dílčích reakcí (zvýšené ukládání kalózy, hromadění obranných PR1 proteinů (pathogenesis related proteins), hromadění sekundárních metabolitů a zvýšená odolnost mladých rostlinek atd.) na konkrétní podnět s přihlédnutím k celkovému momentálnímu stavu rostliny (Clouse 2011, Vaillau *et al.*, 2002, Zheng *et al.*, 2012).

Tab. 1: Přehled specifických ,povrchových antigenních stuktur rostlinných patogenů

Source	MAMPs/DAMPs	Epitope	PRR	PRR Type	References
Bacteria	Flagellin	flg22	FLS2	LRR-RLK	Gómez-Gómez <i>et al.</i> 2001
	Cold-shock proteins	RNP-1 motif	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Felix and Boller 2003
	<i>Xoo</i> derived	<i>unidentified</i>	Xa26	LRR-RLK	Sun <i>et al.</i> 2004
	Ef-Tu	eh8	EFR	LRR-RLK	Zipfel <i>et al.</i> 2006
	Peptidoglycan hairpin	HrpZ	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Erbs <i>et al.</i> 2008
	Ax21	axY ²²	Xa21	LRR-RLK	Lec <i>et al.</i> 2009
	lipopolysaccharides	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Erbs and Newman 2011
Fungi	Peptidoglycan	PGN	LYM1 & LYM3	LysM-RLP	Willmann <i>et al.</i> 2011
	Ergosterol	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Granado <i>et al.</i> 1995
	Cerebrosides	sphingoid base	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Umecmura <i>et al.</i> 2002
	Xylanase	TKLGE pentapeptide	LeEIX2	LRR-RLP	Ron and Avni 2004
	Necrosis-inducing proteins (NLP)	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Mattinen <i>et al.</i> 2004
	Chitin	chitin oligosaccharides	CERK1	LysM-RLK	Shimizu <i>et al.</i> 2010
	β -glucan	β -heptaglucan	GEBP	<i>unidentified</i>	Kishimoto <i>et al.</i> 2011
Oomycetes	β -glucan	hepta- β -glucoside	GnGBP	<i>unidentified</i>	Klarzynski <i>et al.</i> 2000
	Lipid-transfer proteins (elicitins)	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Osman <i>et al.</i> 2001
	Transglutaminase	Pep13	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Brunner <i>et al.</i> 2002
	Cellulose-binding elicitor lectin (CBEL)	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	<i>unidentified</i>	Gaulin <i>et al.</i> 2006
	DAMPs	Prosystemin	systemin	SR160	LRR-RLK
PEPR1		Pep1	PEPR1	LRR-RLK	Krol <i>et al.</i> 2010
Homogalacturonan		oligogalacturonides	WAK1	EGF-RLK	Brutus <i>et al.</i> 2010

Názvy antigenních stuktur (druhý sloupec) a jejich odpovídající receptory (čtvrtý sloupec) (Muthamilarasan *et al.*, 2013)

Dalším příkladem interakce je povrchový TLR4 (Toll-like receptor 4), který reaguje s bakteriálními lipopolysachridy (LPS – složky buněčné stěny Gram-negativních bakterií) a vyvíjí se podobná obranná odpověď, avšak dráha a proteiny zapojené v této odpovědi se diametrálně liší. U živočichů je tato dvojice reagujících komponent velmi podobná (receptor je umístěn na antigen v prezentujících leukocytech) a má za následek rozvoj zánětlivé reakce. Naproti tomu, mutace v *TLR4* genu způsobuje vážné imunodeficientní stavy u člověka a náchylnost k onemocnění běžně nepatogenními bakteriemi u rostlin. (Jones *et al.*, 2004, Ronald *et al.*, 2010)

2.1.2. Úloha efektorů v imunitní odpovědi rostlin

Další, sofistikovanější součástí vrozené rostlinné imunity je efektozem spouštěná imunita (ETI effector triggered immunity, dříve vertikální imunita). Ta bývá komplexnější, rychlejší a cílenější než PTI a rozvíjí se v případě, že patogen první linii obrany překoná pomocí svých efektorových molekul, které injikuje sekrečním systémem typu III (T3SS – typ III secretion system) do rostlinné buňky. Je ale nutno podotknout, že často nelze tyto dva druhy odpovědi přesně odlišit. Protože například signalizace zprostředkovaná R proteiny (ETI) zahrnuje expresi NDR1, EDS1, PAD4 a SAG101proteinů a ty jsou běžně zapojeny v PTI odpovědi (Dempsey *et al.*, 2011).

Podle hypotézy „gen proti genu“, která byla vyřčena již roku 1946 Florem (Flor 1971), jsou efektorové molekuly spouštějící obrannou odpověď kódovány Avr genem patogenu a rostlina na ně odpovídá produkty svých R genů, kterých je jen u *Arabidopsis thaliana* známo kolem 150 (Meyers *et al.*, 2003). Struktura a funkce Avr proteinů se velmi liší u jednotlivých patogenů, zatímco R proteiny jsou konzervované. Avr proteiny mohou inhibovat hostitelskou imunitu spuštěnou rozpoznáním molekul z povrchu patogenu (PTI), maskovat účinky dalších Avr genů nebo měnit metabolismus rostliny za účelem lepšího přístupu k živinám. Chemicky se efektorové molekuly různí. Patří mezi ně např. cysteinové proteasy, ubikvitinu podobné proteasy, E3 ubikvitin ligasy nebo fosfatasy (Abramovitch *et al.*, 2006, Block *et al.*, 2008). U virů to bývají obalové proteiny, proteiny usnadňující symplastický pohyb a replikasy. Houbové Avr proteiny obsahují často mnoho cysteinů, díky jejichž disulfidickým vazbám jsou rozpoznány R proteiny a bakteriální jsou typické *hrp* promotorovým boxem, který zřejmě slouží jako sekreční signál (Martin *et al.*, 2003).

Konzervovaná struktura intracelulárních receptorových R proteinů má N-konec variabilní. Může se tam vyskytovat například TIR doména (toll/interleukin-1-rezistence), jejíž homolog u savců přispívá k rozpoznání a odpovědi na lipopolysacharidy nebo CC doména (coiling-coil). Uprostřed nalezneme doménu vázající nukleotidy (NBS – nucleotide-binding site) a C-konec nese ligand vázající LRR doménu (Maekawa *et al.*, 2011). V nepřítomnosti efektoru je NBS doména chráněná LRR doménou a jeho navázáním se receptor aktivuje a spouští se následná signalizační kaskáda. V rámci klastrů R genů byla zjištěna vyšší rekombinační aktivita než u zbytku genomu, což připomíná mechanismy živočišné adaptivní imunity. Mimoto byla také navržena tzv. „teorie strážců“ (guard hypothesis), podle které R proteiny nerozpoznávají pouze cizorodé Avr proteiny, ale také hlídají integritu určitých vlastních proteinů a při jejich změněné konformaci se spouští kaskáda obranných dějů (Spoel *et al.*, 2012). Nejprozkoumanějším je v tomto ohledu RIN4 protein (RPM1-interacting protein 4), který je fosforylován RIPK (RPM1-induced protein kinase) poté, co se na ni naváže efektor AvrRpm1 z *Pseudomonas syringae*. Následně se RIN4 asociovaný s membránovou H⁺-ATPasou podílí na pohybu svěracích buněk průduchů, které jsou stěžejní v pronikání bakteriálních patogenů do rostliny; toto je ale jen jeden z možných mechanismů fungování RIN4. Touto teorií se dá vysvětlit fakt, že relativně nízký počet R proteinů je schopen odpovídat na mnohem větší počet a variabilitu Avr proteinů (Liu *et al.*, 2011). Dalším příkladem může být efektorová molekula z *P. syringae* AvrPphB (cysteinová proteasa), která štěpí rostlinnou „hlídanou molekulu“ - PBS1 kinasu (*avrPphB* susceptible 1). Tato změna je

detekována produktem R genu – RPS5 (protein ribosomové podjednotky, LRR doména, kinasová aktivita) (Block *et al.*, 2011).

Typickým výsledkem interakce Avr-R je hypersenzitivní reakce (HR) v místě infekce, což je děj nápadně připomínající apoptózu u živočišných buněk. Je to analogie protipožárních ohňů, kterými rostlina oddělí infikované pletivo od zdravého. Dodnes ale nebyly u rostlin zjištěny základní enzymy – kaspasy, které apoptózu realizují, byly ale nalezeny podjednotky proeasomu, které disponují aktivitou podobnou kaspasam, pro jednoduchost se nazývají metakaspasy (Spoel *et al.*, 2012). Hypersenzitivní reakce nemusí být při obranné reakci vždy přítomna a přesto může účinná obrana proběhnout. Je to zřejmě dáno silou nebo množstvím vyvolávajícího podnětu (efektorových molekul) (Tian *et al.*, 2009).

2.1.3. Systémově získaná rezistence

Na infekci nereaguje rostlina pouze v místě infekce - obranou, nýbrž i jako celek, a to systémově získanou rezistencí (SAR – systemic acquired resistance), která se aktivuje většinou po efektoru spuštěné imunitní reakci a chrání celou rostlinu před řadou biotrofních patogenů po delší dobu (signalizace zapojená při SAR je popsána v kapitole: 2.2.1.).

SAR doprovází zvýšená hladina kyseliny salicylové (SA) následovaná expresí obranných genů kódujících PR (pathogenesis related) proteiny. Těchto proteinů je celá řada, jsou rozděleny do 17 skupin. Některé vykazují enzymovou aktivitu (glukanasy, chitinasy) u řady z nich je funkce neznámá (Van Loon *et al.*, 2006). Hromadění SA v rostlinných buňkách je součástí signalizace po percepci efektorových molekul, ale není systémovým signálem, který by buňky informoval o nezbytnosti spuštění obranné kaskády, protože tento systémový signál se začíná hromadit ještě před zvýšením hladiny SA (Durrant *et al.*, 2004, Vlot *et al.*, 2009).

Jedním z kandidátů na zprostředkování SAR je těžký metylsalicylát. Bylo totiž dokázáno, že SABP2 (SA-binding protein, zprostředkovává přeměnu metylsalicylátu na kyselinu salicylovou, má lipasovou aktivitu) defektní rostliny tabáku nebyly schopné rozvinout lokální ani systémovou obrannou reakci (Kumar *et al.*, 2003). Avšak není jisté, zda tento postup funguje i u huseníčku - tam byly jako zprostředkovatelé SAR uvažovány proteiny přenášející lipidy (LTP, lipid-transfer proteins) zařazené do skupiny PR-14. LTP1 a 2 patří mezi dvě hlavní skupiny LTP zapojené v přímé nebo nepřímé obraně rostlin. LTP mají schopnost přenášet fosfolipidy mezi membránami *in vitro*. Mezi sebou si nejsou LTPs příliš sekvenčně podobné, ale sdílejí motiv osmi cysteinů a čtyři α -helixy spojené disulfidovými můstky, tvořící hydrofobní dutinu. Typickým je poměrně vysoký isoelektrický bod – kolem pI 9 (Yeats *et al.*, 2008). Původně se předpokládalo, že usnadňují lipidovou komunikaci uvnitř buňky, ale později se ukázalo, že jsou přítomny ve velkém množství v extracelulárních prostorech. LTP působí přímou antibakteriální aktivitou a současná přítomnost vápníkových iontů tuto vlastnost ještě potencuje. Ukázalo se také, že LTP izolovaný ze semen cibule má schopnost permeabilizovat membránu patogenů, ale ne hostitelských buněk (Regente *et al.*, 2005).

Zjistilo se také, že mutant *A. thaliana dir1* (defective in induced resistance 1) nemá schopnost rozvinout SAR, ale jeho schopnost lokální obranné reakce zůstává zachována. Avšak rostliny zvýšeně exprimující DIR1 protein nezískaly konstitutivní schopnost rozvinout SAR, takže se předpokládá, že k úspěšnému rozvinutí SAR je zapotřebí ještě dalších reakčních partnerů.

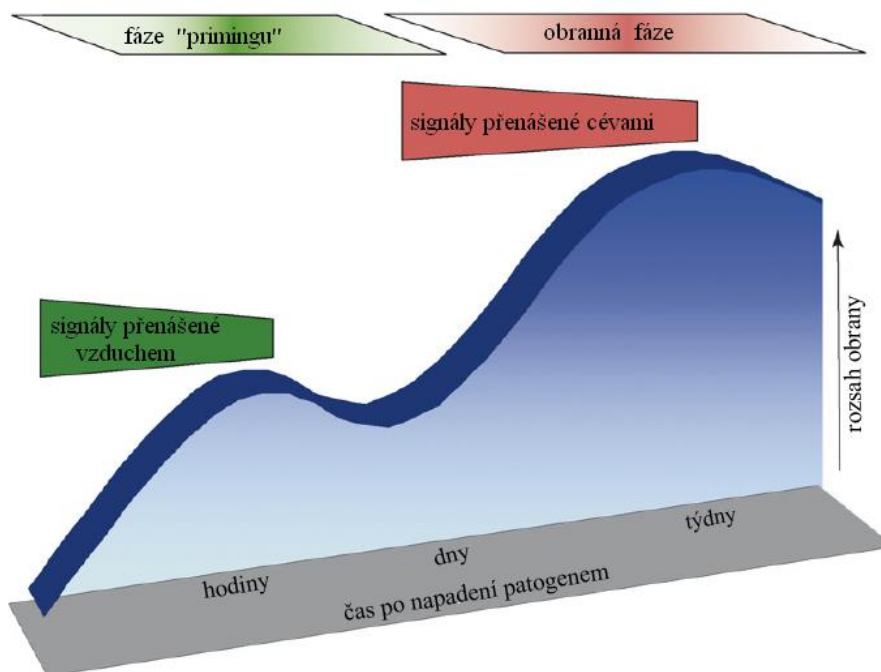
U tabáku se uvažovalo, že tímto partnerem pro vyvolání obranné odpovědi je jasmonát (Buhot *et al.*, 2004). Protein DIR1 vykazuje typickou strukturu LTP a může ve své hydrofobní dutině vázat lysostearoylfosfatidylcholin. Otázkou je, jakou má tento komplex funkci (Lascombe *et al.*, 2008). V tabákových buňkách dokonce LTP1 soutěží o receptor s elicitorem z oomycet – elicitem (Buhot *et al.*, 2001). LTP se podílí i na tvorbě kutiny na povrchu rostlin, a tím přispívají k tvorbě konstitutivních obranných bariér.

Neméně zajímavá je představa o tom, že signálem, který přenáší informaci o napadení na delší vzdálenosti, je změna membránového potenciálu u buněk včetně uvolňování vápníku.

Změna elektrického potenciálu membrán patří k nejrychlejším a daleko dosahujícím změnám, ale byla zatím prokázána pouze v interakci herbivorů s rostlinami (Maffei *et al.*, 2007).

Nově se ukazuje, že k rozvoji SAR přispívají i jiné látky, například aminokyselina pipekolová, terpenoid dehydroabietal, dikarboxylová kyselina azelaová a glycerol-3-fosfát. Poslední tři jmenované látky potřebují k rozvoji SAR protein DIR1 a předpokládá se, že celý děj je závislý na dráze kyseliny salicylové (Yu *et al.*, 2013).

Heil se ve své práci zaměřuje na porovnání systémových signálů, které jsou těkavé a těch, které se přenášejí cévním systémem rostlin. Signály přenášené vzduchem (etylen, metylsalicylát, metyljasmonát a další) podle něj mají schopnost spustit tzv. priming ve vzdálenějších částech rostliny, to znamená, že se rostlina do jisté míry připraví na možné napadení v budoucnu, ale zároveň nemusí spotřebovat velké množství energie na dokonanou obranu. Obrana spuštěná pomocí těkavých sloučenin je sice rychlejší, ale není tak účinná (Obr. 1) (Heil *et al.*, 2008). Úloha sekundárních metabolitů v obraně rostlin je diskutována v kapitole: 2.4.2.



Obr.1: Model dvoustupňové regulace systémově získané rezistence. Upraveno podle (Heil *et al.*, 2008).

2.2. Signalizace v obranných reakcích rostlin

Mezi percepcí antigenních patogenních struktur a výslednou hypersenzitivní reakcí nebo produkcí obranných proteinů a sekundárních metabolitů probíhá složitý komplex signalizačních reakcí. I když se v posledních letech objevilo mnoho nových informací, není do detailů známo, jakými kroky je PTI propojena s ETI nebo jakým mechanismem se informace o infekci rozšiřuje po celé rostlině. V současné době je lépe popsána interakce tří hlavních nízkomolekulárních látek vznikajících během obranné odpovědi jako reakce po interakci receptoru s PAMP nebo efektorů: kyseliny salicylové (SA), kyseliny jasmonové (JA) a etylenu (ET), do signální sítě se zapojují i kyselina abscisová (ABA), brassinosteroidy, auxiny, strigolakton a mnoho dalších látek, u kterých se původně uvažovalo spíše o zapojení do vývoje rostlin nebo jejich funkce nebyla vůbec známá. V současné době se na rostlinu a její signalizaci začíná pohlížet komplexněji a je jisté, že signalizace vedoucí k obraně zahrnuje vychýlení rovnováhy mnoha rostlinných hormonů najednou. Postupně se začínají odkrývat jednotlivé kroky během konkrétních obranných dějů, jejich načasování a kompartment, kde tento děj probíhá a klíčové kontrolní body, kde může být dráha vychýlena jiným směrem (Robert-Seilantantz *et al.*, 2011 a).

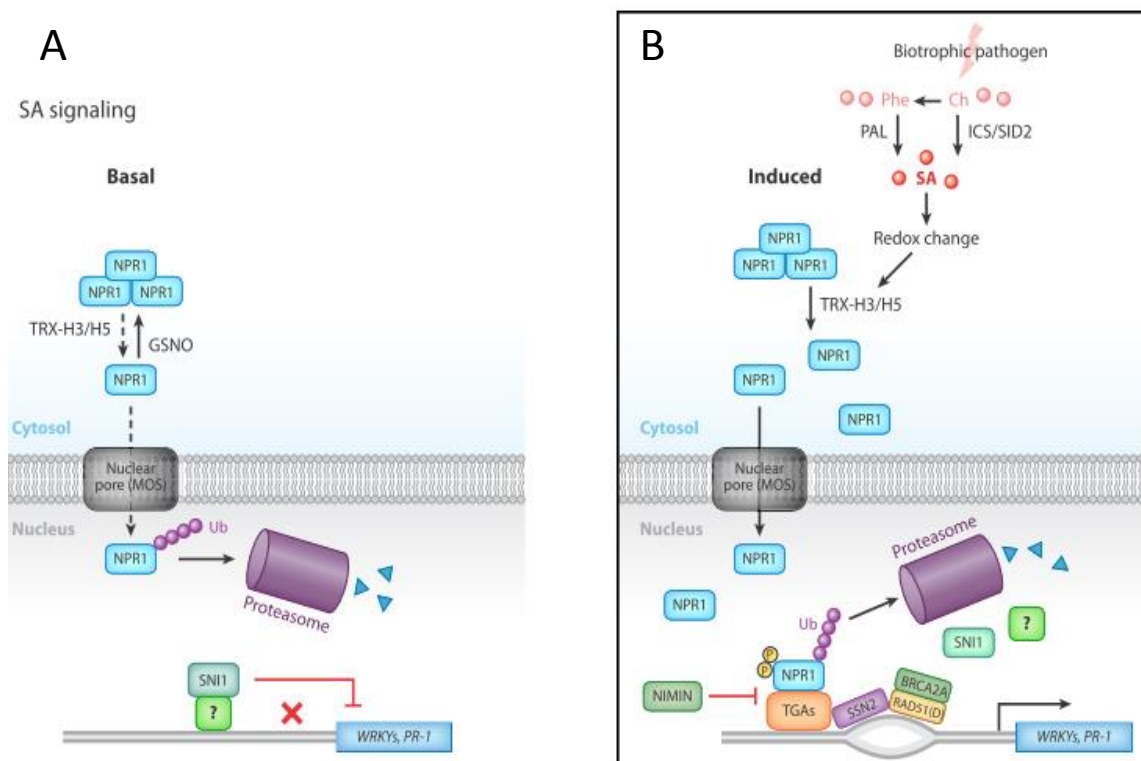
2.2.1. Signalizace v obranných reakcích proti patogenům

Na počátku PTI se kromě obecných signalizačních dějů, jako je uvolnění vápníku, reaktivních forem kyslíku (ROS), reaktivních forem dusíku (RNS) a přestavby cytoskeletu (tyto děje jsou často přechodné a striktně kompartmentalizované), aktivují lipasam podobné proteiny EDS1 a PAD4 (enhanced disease susceptibility 1, phytoalexin deficient 4), které následně vedou ke spuštění biosyntézy SA (m.j. také zesílením signálu amplifikační smyčkou mezi těmito dvěma ději, kdy jeden děj aktivuje průběh druhého). Během ETI záleží na tom, jaký typ receptoru byl efektozem aktivován, jestliže to byl TIR-NBS-LRR (toll/interleukin-1-rezistence), biosyntéza SA začíná stejnými kroky jako u PTI, ale jestliže byl aktivován CC-NBS-LRR (coiling-coil) typ receptoru, biosyntéza SA se spouští přes aktivaci NDR1 (non-race-specific disease resistance 1) proteinu (Bernoux *et al.*, 2011).

Syntéza SA probíhá u rostlin dvěma paralelními drahami: v prvním případě je prekursorem fenylalanin, který je metabolizován fenylalaninamoniaklyasou (PAL) v cytoplasmě, ve druhém případě je prekursorem chorismát přeměňovaný isochorismát syntasou (ICS1/SID2/EDS16 - isochorismate synthase/SA-induction deficient 2/enhanced disease susceptibility16) na isochorismát a přes benzoovou kyselinu na SA, tato dráha probíhá v chloroplastech. Po bakteriální infekci je preferována isochorismátová dráha, dráha PAL je minoritní. Předpokládá se, že PAL dráha se spouští při dysfunkci chloroplastů, která je způsobená nadbytkem ROS. V případě syntézy v chloroplastu je však nutná účast transportérového proteinu z rodiny MATE (multidrug and toxin extrusion) - SID1/ EDS5, který přenáší SA z chloroplastu do cytoplasmy (Dempsey *et al.*, 2011, Xing *et al.*, 2013). Extracelulárně přítomná (např. přidáním během experimentu) SA přechází velice rychle do buňky zatím nepoznaným přenašečem. Zvýšená hladina SA spouští signální dráhu vedoucí k expresi PR1 proteinu, který je zároveň hlavním sledovaným markerem během biotického

stresu (exprimuje se ale i po abiotickém stresu) a kromě toho se spouští exprese i dalších PR proteinů – PR-2 (β -1,3-glukanasa) a PR-5 (thaumatin) (Van Loon *et al.*, 2006).

Zvýšená hladina SA nějakým způsobem souvisí s nárůstem redukčního prostředí v buňce a monomerizací oligomerního proteinu NPR1 (nonexpressor of PR genes1), tento koaktivátor přechází jadernými póry konstitutivně do jádra a spolu s WRKY (hlavně 38 a 62) a TGA transkripčními faktory (název obou transkripčních faktorů je odvozen od konzervované proteinové sekvence) spouští expresi PR1 a dalších SA responsivních genů například přes cis-responsivní element *as-1* (Obr. 2) (Pieterse *et al.*, 2012). Některé geny (*GST6*, - glutathion-S-transferasa a *EIGT*, - glucosyltransferasa), které se exprimují po aktivaci *as-1* elementu přes signalizaci SA, ale i auxinu (2,4,-dichlorfenoxyoctové kyseliny) jsou nezávislé na zapojení NPR1 proteinu v signální dráze. Bylo zjištěno, že tato NPR1 independentní dráha se v odpovědi na SA a auxin aktivuje v časně fázi signální kaskády po rozpoznání patogenu, kdežto NPR1 dependentní dráha se po těchto signálech aktivuje později (Uquillas *et al.*, 2004). Zajímavý je také mechanismus antagonismu auxinové a SA signalizace, auxin (indolyloctová kyselina, IAA) například inhibuje expresi PR proteinů a inhibuje dosud neznámým mechanismem biosyntézu SA. Ale funguje to i naopak, SA inhibuje reakce vedoucí k projevům genů ovlivněných auxinem. Molekula auxinu se váže k jadernému TIR1 (transport inhibitor response 1) receptoru tak, že TIR1 doslova slepí s AUX/IAA adaptorovým proteinem. AUX/IAA je původně vázán na ARF (auxin response factor) transkripční faktor a brání mu nasednout na příslušný cis-element (AuxREs) a začít expresi auxin-responsivních genů. Molekula auxinu vlastně uvolní AUX/IAA z vazby na transkripční faktor, naproti tomu SA koreceptor AUX/IAA na jeho původním místě stabilizuje a k expresi auxin-responsivních genů nemůže dojít. Geny pro ARF1 a 9 transkripční faktory jsou navíc blokovány pomocí miRNA393, jejíž hladina vzroste 20 a 60 min po percepci flg22 buňkou. Tímto mechanismem se také potlačuje exprese genů auxinové dráhy. Velice zajímavý je odklon biosyntetické dráhy auxinu u *A. thaliana*, která se může v závislosti na vnějších podmínkách přeměrovat k syntéze obranných sekundárních metabolitů (Robert-Seilantantz *et al.*, 2011 b).



Obr. 2: Schéma mechanismu signalizace salicylové kyseliny (SA).Rostlina s inaktivní SA signalizační dráhou (A) má promotor pro SA responsivní geny (*WRKYs* a *PR-1*) blokován SNI1 proteinem, po akumulaci SA (B) v buňce se monomerizuje NPR1 protein a přechází do jádra, kde se váže k TGAs transkripčním faktorům. SNI1 protein je odstraněn z promotoru pomocí komplexu proteinů SSN2 a RAD51D, které spolu s proteinem BRCA2A usnadní iniciaci transkripce SA responsivních genů. Převzato z (Pieterse *et al.*, 2012)

Obecně je přijímaný fakt, že SA zprostředkovává obranu proti biotrofním patogenům a JA často společně s ET proti nekrotrofním patogenům a proti mechanickému poškození a tyto dvě hlavní signální dráhy jsou v antagonistickém vztahu, podobně jako je to pozorováno u živočichů, kdy biosyntetickou dráhu prostaglandinů (strukturní analogy jasmonátů) inhibuje SA. V posledních letech se objevují mnohé výjimky a zjišťuje se, že jde o překrývající se děje, které nemají jednoznačně vymezenou funkci u jednoho typu patogenu, ale reagují podle momentálních podmínek s cílem ušetřit rostlině co nejvíce energie během obrany a jemně kompenzovat vzniklé problémy. Jsou to spíše jakési nástroje, které mohou být spuštěny velkým množstvím dějů a vedou k jednotlivým způsobům obrany (Koornneef *et al.*, 2008). Během výzkumu obranných reakcí se pozornost zaměřovala hlavně na signalizaci SA, JA a ET, skutečnost je ale taková, že se do obranné odpovědi zapojuje mnoho hormonálních a signálních látek a společně jemně modulují výslednou reakci podle momentálních potřeb rostliny. Zvýšení hladiny giberelinů vede ke zvýšení SA signalizace a inhibuje JA/ET signalizaci. ABA naproti tomu podporuje JA/ET signalizaci (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011 b). Bylo zjištěno, že ET produkovaný *Arabidopsis thaliana* po napadení herbivory připravuje rostlinu na možnost rychlejší obranné reakce zprostředkované SA třeba po virové infekci (De Vos *et al.*, 2006). Také se ukazuje, že transkripční faktor MYC2 (syn.: JAI1, JIN1, ZBF1) a ERF1 (ehtylen response factor 1) jsou uzlovými body, které shromažďují informace z více signálních drah a za různých podmínek. Transkripční faktor MYC2 (napomáhající exprimovat

rozsáhlou sadu JA responsivních genů) aktivuje expresi genů synergickým působením JA a ABA po zranění a transkripční faktor ERF1 je aktivován společným působením JA a ET po napadení patogeny a v obou případech se aktivují geny odpovídající na signalizaci prostřednictvím JA. Navíc transkripční faktor WRKY33 a 53, zapojený v SA signalizaci je také negativně regulován MYC2 (Dombrecht *et al.*, 2007). Působení JA na auxiny pomáhá udržovat přiměřený vývoj rostliny i při percepci patogenů, například tím, že se po působení vyšší hladiny auxinu zvýší apikální dominance a více roste vrchol rostliny, který bývá častější obětí patogenů a herbivorů (Zavala *et al.*, 2006).

Z dosavadních poznatků vyplývá, že dvě základní signální dráhy (SA, JA) se propojují a různě ovlivňují působením mnoha transkripčních faktorů, induktorů, represorů a jiných proteinů nebo molekul. Pochopit všechny probíhající procesy a sledovat jeden děj za druhým během obranné reakce není se současným množstvím poznatků možné. Laboratoř profesorky Xinnian Dong (USA), kde se zabývá systémově získanou rezistencí (SAR), přispěla významným objevem receptoru pro SA. Během SA signalizace se v cytosolu rozpadá oligomer proteinů NPR1 (nonexpressor of PR genes1) s následnou expresí SA responsivních obranných genů, zatímco exprese JA responsivních genů je během tohoto procesu inhibována (Durrant *et al.*, 2004, Koornneef *et al.*, 2008). NPR1 má dva paralogy NPR3 a NPR4 (nonexpressor of PR genes3 and4), které Dong identifikovala jako receptory pro SA s různou afinitou, SA v tomto případě stabilizuje vazbu k substrátu NPR1. Tyto dva proteiny slouží jako adaptorové proteiny pro CUL3 E3 ligasu, která ubiquitinyluje NPR1 a ten je následně degradován proteasomem. Přejít NPR1 do jádra je nutný pro expresi obranných genů, zatímco degradace NPR1 a hlavně jeho následná syntéza je vyžadována pro rozvoj SAR. Zdá se, že NPR1 potlačuje rozvoj lokální hypersenzitivní reakce a napomáhá rozvoji SAR (Fu *et al.*, 2012). Expresi SA responsivních genů negativně regulují ještě další proteiny NIMIN1 (NPR1/NIM1 interacting 1), 2 a 3 a SNI1 (supressor of NPR1) (Pape *et al.*, 2010).

Na závěr bych ještě chtěla upozornit na mechanismus regulace exprese genů řízených jednotlivými signálními molekulami, který se principem regulace u jednotlivých signálních molekul moc neliší. Mechanismus percepcie a regulace exprese genů odpovídajících na SA a auxin je popsán v předchozích odstavcích. Na příkladu signalizace u JA bude princip podobné regulace vysvětlen. JA se váže na receptor COI1 (coronatine insensitive 1), tato dvojice se váže k JAZ (jasmonate ZIM-domain) adaptorovému proteinu, který je v klidovém stavu vázán na transkripční faktor MYC2 (syn.: JAI1, JIN1, ZBF1), který blokuje v zahájení transkripce JA responsivních genů. Komplex COI1-JA-JAZ, kde JA propojuje oba další, je degradován SCF^{COI1} (Skp1/Cullin/F-box complex, je to E3 ubiquitin ligasa) dependentním způsobem, to znamená, že je nakonec eliminován proteasomem. Podobný mechanismus, kdy jsou zapojeny adaptorové proteiny a celý komplex je v případě odblokování transkripčních faktorů degradován přes ubiquitinylacii pomocí proteasomu, je společný pro mnoho signálních molekul: SA, auxin, gibbereliny, ABA, ET a JA (Kazan *et al.*, 2012, Pauwels *et al.*, 2011, Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011 a).

2.2.2. Signalizace v reakci na abiotický stres

V celkovém měřítku způsobují abiotické stresy (sucho, chlad, mráz, vysoká teplota, oxidativní stres, těžké kovy, zasolení, UV záření, změny v profilu dostupných živin, osmotický stres) rostlinám větší škody, než stres způsobený živými organismy. Výhodou pro rostliny však je, že abiotické faktory se plasticky nepřizpůsobují rostlinné obraně, nevýhodou pak, že jich často působí více najednou. Signální dráhy pro abiotický a biotický stres se překrývají, protože často působí mnoho druhů stresu najednou a rostlina se díky působení jednoho stresu může lépe připravit na jiný (Akpınar *et al.*, 2012). Zvýšení hladiny ROS a vápníku bývá velmi ranou reakcí rostlin na abiotický, ale i biotický stres. Tato obecná reakce vede ale k signalizaci již specifitějšími kinasami, transkripčními faktory nebo rostlinnými hormony, které vedou až k expresi funkčních proteinů namířených přímo proti jednotlivým druhům stresu (Akpınar *et al.*, 2012).

Abiotický stres je velmi široký pojem, omezím se tedy pouze na stres způsobený NaCl, protože se přímo dotýká mé experimentální práce a ostatní druhy zmíním pouze v případě nezbytných souvislostí.

Při zasolení trpí glykofytní rostliny hlavně kvůli přítomnosti sodíku, a to už od koncentrace 50 mM, částečně také vadí vznik hypertonického prostředí, jehož přítomnost je rostlinou detekována dříve než efekt sodných iontů. Reakce na solný stres probíhá ve dvou fázích, první nastává, jakmile buňky kořenů rostlin detekují a začnou přijímat sodík přes neselektivní kationtové kanály NSCC (non-selective cation channels). Tato fáze je přechodná a počáteční vstup sodných iontů potom působí jako signál pro děje probíhající ve fázi druhé. Druhá fáze se rozvíjí během hodin až dnů a hlavním jejím projevem je snaha vyloučit sůl z buněk a zároveň zástavení růstu až smrt rostliny v závislosti na toxické dávce. Počátek a rozvoj druhé fáze možná vypadá jako relativně nečinné období, ale ve skutečnosti se v té době odehrávají nejdůležitější děje – signalizace a děje vedoucí k vyrovnání nepříznivého stavu. Rostliny sodík nejprve shromažďují ve vakuole pomocí tonoplastového antiporteru NHX1 a v případě nadměrného množství aktivně vylučují pomocí proteinu umístěného na plasmatické membráně – SOS 1 (salinity overly sensitive 1 – Na⁺/H⁺ antiporter) (Ismail *et al.*, 2014, Mahajan *et al.*, 2005).

Signalizace, která vede ke snížení toxicity sodíku zahrnuje vznik ROS, zvýšení hladiny sekundárních posílů: vápníku a kyseliny fosfatidové a hromadění oxidu dusnatého. Tyto signály jsou potom přenášeny MAP kinasami (MAPK, mitogen activated protein kinase) signalizační kaskádou, kde se odpovědi na zasolení a hyperosmolaritu účastní hlavně MAPK 6 (vede k aktivaci SOS1 kanálu), MAPK 3 a 4. MAPK 4 a 6 zprostředkovávají signalizaci i při chladovém stresu (Smekalova *et al.*, 2014). Zvýšení hladiny uvedených sekundárních posílů dochází po zvýšení hladiny ABA (abscisic acid). ABA je jedním z mnoha hormonů účastnících se abiotického stresu, ale jako jediný je lépe popsán. Signalizace prostřednictvím ABA reguluje u huseníčku asi 10% všech genů a je zapojena u stresu ze sucha, nízké teploty, mechanického poškození, zasolení a vývojových procesech. V jednom z popsáných mechanismů spouštěných po percepci ABA buňkou přestane fosfatasa PP2C (phosphatase 2C) blokovat fosforylaci kinasy SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2). SnRK2 fosforyluje iontové kanály, membránové proteiny nebo transkripční faktory (AREB - ABRE-binding, DREB – dehydration-responsive element binding protein), které potom aktivují expresi

genů přes cis-elementy například ABRE, (ABA-responsive element) během dehydratace, zasolení rostliny a dozrávání semen. Pomocí SnRK2 je regulován i chloridový iontový kanál SLAC1 (slow anion channel associated 1), ale i draslíkový kanál KAT1 (K⁺-inward rectifying channel) při zavírání průduchů během sucha. Cílem ABA signalizace jsou i transkripční faktory WRKY 40, 18 a 60, které však jsou negativními regulátory ABA signalizace (Danquah *et al.*, 2014).

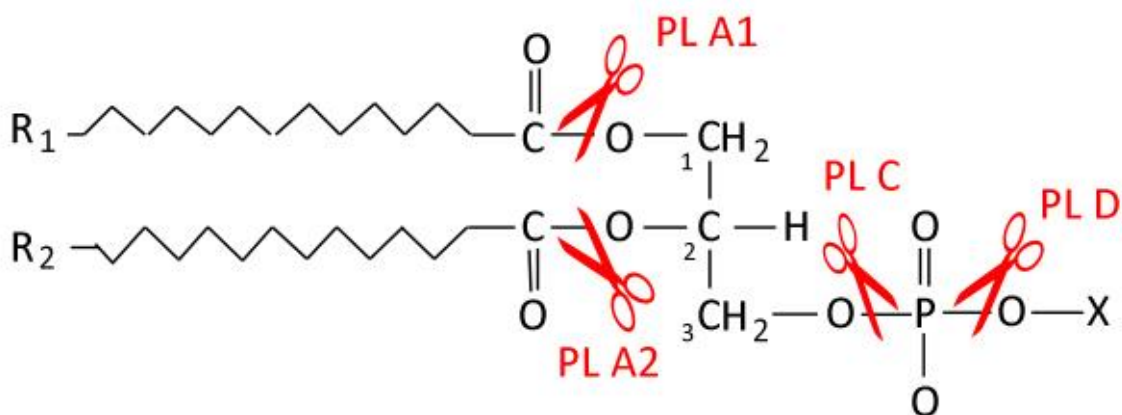
Kromě ABA se však během abiotického stresu současně zapojují i další hormony: auxiny, cytokininy, gibereliny (GA), JA, SA, brassinosteroidy (BR), strigolaktony a ethylen (ET). U rýže se během sucha zvyšovala nejen hladina ABA, ale i JA. Podobný efekt byl pozorován u ječmene po zasolení. Předpokládá se, že v tomto případě JA napomáhá při vzniku buněčné smrti, kdežto ABA zprostředkuje sekvestraci NaCl do vakuoly nebo jeho vylučování. Během sucha i zasolení je přes ABA zprostředkována zástava růstu rostliny tím, že inhibuje isopentenyltransferasu (IPT), klíčový enzym při biosyntéze cytokininů a zároveň ovlivňuje i signalizaci pomocí auxinů, GA a ET. Růst rostliny se zastaví i po vyřazení GA signalizace, která je zapříčiněná funkcí transkripčních faktorů DREB 1 a ERF v signálních drahách ABA a ET při suchu a zasolení. Hladina ABA v rostlinách ovlivňuje biosyntézu strigolaktonů, protože mají podobné prekursory. Strigolaktony např. u rýže inhibují růst postranních pupenů, navíc jsou spolu s auxiny a ET zapojeny při tvorbě a prodlužování kořenových vlásků. Antagonistický efekt mezi ABA a cytokininy byl pozorován i při regulaci zavírání průduchů. Zvýšení hladiny BR vylepšuje kondici rostlin při zasolení a suchu, což nastává společně s nárůstem hladiny ABA a NO (Colebrook *et al.*, 2014, Ismail *et al.*, 2014, Kohli *et al.*, 2013). Podstatnou měrou se při odpovědi rostlin na zasolení podílí také fosfolipidová signalizace, především fosfolipasy A2, C a D a to hlavně produkcí druhých poslů: lysofosfolipidů, inositol 1,4,5-trisfosfátu (IP₃), diacylglycerolu (DAG) a kyseliny fosfatidové (PA) (Meijer *et al.*, 2003, Wang 2002). Exprese fosfolipasy Dδ (PLDδ) se zvyšuje už po 2h po působení soli a po 10h působení sucha u huseníčku. V odolnosti proti soli je zapojena i fosfolipasa Dα1 a 3 (PLDα1 a PLDα3). Násobné mutanty huseníčku s těmito geny vyřazenými z funkce byly citlivější k soli než jednoduché mutantní linie (Katagiri *et al.*, 2001). Kyselina fosfatidová (PA) – druhý posel vznikající hydrolyzou fosfolipidů působením PLD se také začíná hromadit v buňkách po působení soli a může aktivovat expresi obranných genů. Toto bylo popsáno v případě PA vzniklé působením PLDα1 na fosfatidylcholin, která reaguje s MAPK6 a ta následně aktivuje SOS 1 transportér eliminující sodné ionty z buňky. Mutant *plda1* nebyl schopen uzavírat průduchy. Kvůli necitlivosti k ABA přes signalizaci pomocí ROS – PA totiž aktivuje i NADPH oxidasu jako zdroj ROS (Yu *et al.*, 2010). *In vitro* bylo dokázáno, že PA odvozená z PLDα1 se váže i na kinasu SnRK2 zapojenou v ABA signalizaci (McLoughlin *et al.*, 2012). Váže se také na protein MAP65-1, který propojuje mikrotubuly a stabilizuje je. Právě navázání PA na MAP65-1 podporuje stabilizaci mikrotubulů a to má pozitivní efekt při odolnosti během zasolení. Mikrotubuly se během odpovědi na solný stres rozpadají a tato reakce byla výraznější u *plda1* mutantu, přidání PA naopak kondici mikrotubulů zlepšilo a tím zlepšilo i odolnost rostlin *A. thaliana* k solnému stresu (Zhang *et al.*, 2012). PLDα1 se sama k mikrotubulům neváže a působí pouze přes PA, avšak *in silico* i *in vitro* byla prokázána přímá vazba mikrotubulů k PLDδ a předpokládá se, že PLDδ je můstkem spojujícím mikrotubuly s plasmatickou membránou (Gardiner *et al.*, 2001). Přidání NaCl rozrušilo tuto vazbu a způsobilo odpojení mikrotubulů od plasmatické membrány a jejich depolymerizaci

(Dhonukshe *et al.*, 2003 a). Zdá se tedy, že stabilizace mikrotubulů je důležitý krok při účinné obraně rostliny během solného stresu, ale tato stabilizace musí být správně načasovaná. Když totiž byly mikrotubuly stabilizovány taxolem a poté byla aplikována sůl, zvýšila se úmrtnost rostlin. Počáteční depolymerizace mikrotubulů následovaná tvorbou úplně nové mikrotubulární sítě s jiným „úkolem“ je zřejmě nezbytnou podmínkou k tomu, aby reakce všech proteinů proběhly včas a na správném místě a vyústily v účinnou obranu proti abiotickému stresu (Wang *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2012).

2.2.3. Fosfolipidová signalizace v obranných reakcích

Integrita a správná funkce cytoplasmatické membrány patří k základní výbavě buňky schopné odolávat nepříznivým vnějším vlivům. Představa modelu fluidní mozaiky z roku 1972 chápala plasmatickou membránu jako fosfolipidovou dvojvrstvu (kde jsou zastoupeny i glykolipidy, sfingolipidy a steroidní struktury) protknutou množstvím integrálních i periferních proteinů (Singer *et al.*, 1972). Fosfolipasy hydrolyzují fosfolipidy a tím přímo mění složení plasmatické membrány, jejich alespoň dočasná lokalizace na plasmatické membráně se tedy předpokládá. U některých členů všech hlavních skupin fosfolipas byla zjištěna, nebylo ale zatím dokázáno, zda se vyskytují uspořádané ve specifických doménách nebo cytoskelet kopírujících útvech (Chen *et al.*, 2011, Pokotylo *et al.*, 2014). Hydrolýzou membránových fosfolipidů vytvářejí fosfolipázy nejen několik důležitých sekundárních poslů, ale také mění zakřivení plasmatické membrány a vytvářejí tak platformu pro různé děje na plasmatické membráně. Fosfolipidy se liší nejen složením polárních hlavic, ale i složením řetězců mastných kyselin, kterými jsou zanořeny v lipidové dvojvrstvě. V rostlinných membránách je nejvíce zastoupen fosfatidylcholin (PC) a fosfatidyethanolamin (PE), zbytek tvoří fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylserin (PS) a fosfatidylinositol (PI) a kyselina fosfatidová (PA); nepolární řetězec bývá nejčastěji tvořen kyselinou palmitovou (16:0) a linolovou (18:2), méně je zastoupena kyselina linolenová (18:3) (Murphy *et al.*, 2011).

Fosfolipasy a fosfolipidová signalizace má v rostlinném metabolismu, vývoji i při odpovědích na vnější vlivy velmi významné místo. U *A. thaliana* bylo popsáno mnoho fosfolipas a pro zjednodušení se dělí do čtyř hlavních skupin, podle místa štěpení fosfolipidové molekuly. (Obr.3) V rámci těchto skupin se fosfolipasy dále dělí podle biochemických vlastností a proteinové struktury. Skupina fosfolipas A (PLA1 a 2) patří k největším a členové této skupiny jsou zapojeni v mnoha buněčných dějích, jejich působením vznikají volné mastné kyseliny a lysofosfolipidy. Činností fosfolipas C (PLC) vznikají sekundární poslové diacylglycerol (DAG) a inositoltrisfosfát (IP3), který bývá v rostlinách fosforylován na inositolhexafosfát (IP6), který má rovněž funkci sekundárního posla. DAG může být DAG-kinasou fosforylován na další molekulu s funkcí druhého posla – kyselinu fosfatidovou (PA). Podle toho, jaký substrát PLC štěpí preferenčně, se tato skupina dělí na PI-PLC (fosfatidylinositol-PLC) a skupinu nespecifických PLC (NPC) jejichž substrátem je většinou fosfatidylcholin (Arisz *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2011, Munnik *et al.*, 2010)



Obr. 3: Schema míst, kde jednotlivé fosfolipasy štěpí fosfolipidy. Upraveno podle (Wang 2002).

Poslední skupina – fosfolipasa D (PLD) bude popsána podrobněji, protože velká část této práce se zabývá úlohou PLD v signálních drahách spouštěných biotickým a abiotickým stresem. K nejprobádanějším patří PLD z *A. thaliana*, kde bylo nalezeno 12 isoform rozdělených podle biochemických vlastností do pěti skupin označovaných α , β , γ , δ a ζ . (Tab.2). PLD α je aktivována vysokými, nefyziologickými koncentracemi vápenatých iontů, isoformy PLD β a γ jsou aktivní při mnohem nižší koncentraci vápenatých iontů a vyžadují přítomnost fosfatidylinositol 4,5- bisfosfátu (PIP₂) a působí na smíšené mycely substrátu (PC + PE). Isoforma PLD δ se vyznačuje tím, že je aktivní pouze v přítomnosti kyseliny olejové, PLD ζ jako jediná nevyžaduje přítomnost vápenatých iontů. Jednotlivé skupiny isoform se také liší preferencí k různým substrátům.

Všechny PLD mají dvě katalytické domény zajišťující lipasovou aktivitu. Pro ně je typický konzervovaný HxKxxxxD (HKD) motiv sekvence aminokyselin. Strukturně lze rozdělit PLD do dvou skupin podle toho, zda se v jejich struktuře nachází C2 doména závislá na vápenatých iontech a vázající fosfolipidy. C2 doména se vyskytuje u isoform PLD α 1, α 2, α 3, α 4 (synonymum ϵ), β 1, β 2, γ 1, γ 2, γ 3 a δ . Zbývající dvě isoformy PLD ζ 1 a ζ 2 obsahují naproti tomu tzv. PX/PH (phox a plekstrin homologní) domény a tím se velmi podobají dvěma nalezeným savčím PLD1 a 2, které ke své funkci nevyžadují vápenaté ionty.

Tab.2: Srovnání biochemických požadavků jednotlivých izoform PLD.

PLD type	Signature property			
	Ca ²⁺	PI(4,5)P ₂	Oleate	Substrate preference
PLD α 1	mM/ μ M	-/+	-	PC>PE
α 3	mM	-/?	-	PC>PE, PG
ϵ	mM/ μ M	-/?	-/+	PC = PE>PG
PLD β 1	μ M	+	-	PC = PE
PLD γ 1	μ M	+	-	PE>PC
γ 2	μ M	+	-	
PLD δ	μ M-mM	+	+	PE>PC
PLD ζ 1	No	+	-	PC
ζ 2	#			

PI(4,5)P₂ – fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát, PE – fosfatidylethanolamin, PC – fosfatidylcholin, PG – fosfatidylglycerol. Převzato od (Li *et al.*, 2009)

U PLD γ 2 byl nalezen tzv. DRY motiv, kterým PLD interaguje s α podjednotkou G-proteinu, přímá vazba na α podjednotku G proteinu byla prokázána i u PLD α . Funkce PLD δ (a částečně i PLD ϵ) je podmíněna přítomností kyseliny olejové a navíc byla ve struktuře isoformy PLD δ nalezena vazebná místa jak pro tubulin, tak i pro aktinové podjednotky. Vazba k aktinu se potvrdila i u PLD β 1. Většina PLD je lokalizována m.j. na plasmatické membráně, PLD γ na intracelulárních membránách, PLD ζ 2 byla nalezena pouze na tonoplastu. V celé rostlině se nejvíce vyskytuje PLD α 1 a δ , ostatní isoformy mají minoritní zastoupení. Jen v pylu bylo nalezeno výraznější zastoupení isoform PLD α 2, ϵ , β 1, β 2 a δ (Chen *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2009, Wang 2002).

Podstatou funkce PLD je odštěpení části polární hlavice (většinou cholinu, glycerolu nebo ethanolaminu) za vzniku kyseliny fosfatidové, která zůstává zanořena v membráně a plní zde funkci druhého posla během signalizačních kaskád u většiny fyziologických i patologických dějů v rostlině. Kyselina fosfatidová (PA) může vznikat i působením PLC, kdy se odštěpí celá polární hlavice (většinou fosfatidylinositoltrifosfát) a nepolární zbytek (DAG) je fosforylován na PA pomocí DAG kinasy. DAG patří k významným druhým poslům u živočichů, u rostlin je většinou ihned fosforylován.

PLD katalyzuje i tzv. transfosfatidylační reakce, kdy akceptorem fosfatidylového zbytku není molekula vody, nýbrž hydroxylová skupina primárního alkoholu, takže vzniká nefunkční fosfatidylalkohol. Nejvhodnějším substrátem je 1-butanol (n-butanol). Toho se využívá při výzkumu, kdy se přidáním 1-butanolu blokuje produkce PA, ale aktivita se např. u PLD δ v přítomnosti 1-butanolu zvyšuje (Bargmann *et al.*, 2006, Meijer *et al.*, 2003).

PLD jsou zapojeny v signalizaci mnoha obranných odpovědí buď přes funkci PA nebo podobné signální molekuly, remodelaci membrány a nebo vazbou na rostlinný cytoskelet (poslední zmíněné je podrobně popsáno v kapitole 2.3.1.4.1. a 2.3.1.3.2.).

Bakteriální infekce zvyšuje aktivitu PLD na plasmatické membráně (Gardiner *et al.*, 2003).

Po působení PAMP – xylanasy se v huseníčku zvyšovala exprese PLD β 1 isoformy, která je schopná vytvářet signální molekulu N-acyl ethanolamin (NAE) z přirozeně se vyskytujícího N-acylfosfatidylethanolaminu (NAPE). NAE už v nanomolárních koncentracích aktivuje klíčovou molekulu fenylypropanové dráhy – fenylyalaninamoniaklyasu (PAL), která se účastní dráhy biosyntézy sekundárních metabolitů nebo signálních molekul. NAE (12:0) se také používá jako specifický inhibitor PLD α 1. Fluorescenčně značená PLD β 1v buněčné kultuře rajčete (*Lycopersicon esculentum* = *Solanum lycopersicum*) byla po aktivaci elicitorem pozorována jako jednotlivé body v cytoplasmě. (Bargmann *et al.*, 2006, Jia *et al.*, 2013, Meijer *et al.*, 2003). Odpověď rostlin na napadení patogeny zahrnuje i produkci ROS, bylo zjištěno, že tato produkce se prudce zvyšuje během SA signalizace právě přes působení PA produkované činností PLD a vede k uzavření průduchů po napadení patogeny (Gardiner *et al.*, 2003). Naopak po působení inhibitoru vzniku PA – n-butanolu se v suspenzní kultuře *A. thaliana* netvořil PR1, což je marker SA signalizace (Kalachova *et al.*, 2013, Krinke *et al.*, 2009). Rezistenci proti penetraci padlí travního (*Blumeria graminis*) zprostředkovává výlučně signalizace před PLD δ , která se shromažďuje na membráně okolo tvořící se papily a nějakým způsobem se zde účastní regulace polárního transportu antimikrobiálních látek a snad i regulace směřování a množství PAMP receptorů i pro jiné patogeny (Pinosa *et al.*, 2013).

Během sucha zprostředkovává PLD α 1 zavírání průduchů signalizací přes interakci PA s α podjednotkou heterotrimerního G proteinu a následnou ABA signalizací (PA se váže i na ABI1 fosfatasu, která zabraňuje spuštění exprese ABA responsivních genů), zatímco PLD α 3 ovlivňuje odlišným mechanismem zvýšený růst kořenů. Mutantní linie *plda3* jsou hypersenzitivní vůči suchu a zasolení. Je zapojena i PLD ϵ , která prostřednictvím PA indukuje růst kořenových vlásků při solném stresu (Bargmann *et al.*, 2009 b, Bargmann *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2009).

PLD α 1 a PLD δ se buď cílenou degradací, nebo ochranou membránových lipidů podílejí na reparačních reakcích po působení mrazu. Obě tyto fosfolipasy jsou zapojeny jak při indukci, tak i při odpovědi na ROS během dehydratace i zasolení. Vznikající PA se totiž přímo váže na PA vazebný motiv v molekule NADPHoxidasy (AtrbohD a AtrbohF – respiratory burst oxidase homolog) (Bargmann *et al.*, 2006, Hong *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2009). Zvýšení exprese obou isoform – PLD α 1 i δ bylo mnohokrát referováno při stresu z nedostatku vody, ať už se jednalo o sucho, osmotický stres, zasolení, chlad nebo mráz (Bargmann *et al.*, 2006, Meijer *et al.*, 2003).

Po zranění se zvyšovala exprese PLD β 1, γ 1 a γ 2 vedoucí k aktivaci MAPK kaskády a biosyntézy JA. (Meijer *et al.*, 2003). Po zranění i mechanickém poškození mrazem bylo u rostlin s umlčeným *PLD α 1* genem zjištěno snížené hromadění PA a nižší i následná JA signalizace (Bargmann *et al.*, 2006).

PLD ζ 2 napomáhá při redistribuci PIN2 (polárního exportéru auxinu z buňky) na plasmatické membráně v kořenech. Podílí se tak na udržování gravitropismu a prodlužování hypokotylů (Li *et al.*, 2009).

V průběhu senescence se zvyšuje exprese isoform PLD α 1 a PLD δ , které následnou aktivací ABA a ET indukují enzymy degradující lipidy v membránách (Jia *et al.*, 2013).

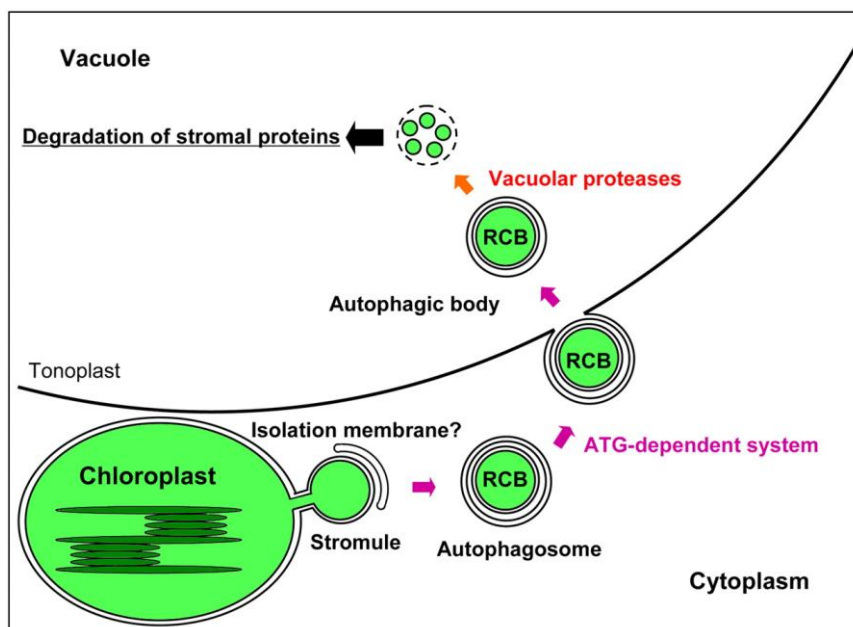
2.3. Subcelulární změny při obranných reakcích

Po stresové zátěži reagují rostlinné buňky nejen na biochemické, ale i na histologické úrovni četnými změnami, které jsou přímo pozorovatelné.

Po tom, co jsou buňky listu *A. thaliana* vystaveny hrozbě průniku houbových hyf se pod místem kontaktu patogenu s plasmatickou membránou začnou během několika minut shromažďovat mikrotubulová i aktinová vlákna, navíc do těchto míst putují i peroxisomy a endoplasmatické retikulum. (Hardham *et al.*, 2008)

Při stresové odpovědi se někdy v rostlinných pletivech po biotickém i abiotickém stresu v rámci ETI rozvíjí hypersenzitivní reakce - HR (hypersensitive response) v mnoha rysech velmi podobná programované buněčné smrti – PCD (programm cell death). Byla popsána v roce 1915 Stakmanem, avšak stále není objasněných mnoho jevů, které ji doprovázejí. (Stakman 1915) Rozvoj HR a doprovázející reakce v okolních buňkách se mohou velmi lišit v závislosti na vyvolávajícím faktoru. Na počátku reakcí vedoucích k HR bývá prudký vzestup hladiny vápníku v cytosolu, zvyšuje se také množství volných kyslíkových i dusíkových forem (ROS, RNS), vzrůstá aktivita kinas, jádro putuje při penetraci hub k místu průniku, zastavuje se cytosolické proudění uvnitř buněk, zvyšuje se aktivita kaspas podobných proteas a nakonec se fragmentuje DNA v jádře. Buňky v okolí buněk podstupujících HR mění také svůj metabolismus, což vede například k zesilování buněčné

stěny. Navíc se zjistilo, že v okolí buněk tabákové suspenzní kultury, které podstupovaly HR, se silně alkalizovalo prostředí, což napomáhá i při ukládání kalosy v rostlinných pletivech. (Heath 2000, Nielsen *et al.*, 2012) V okolí buněk, kde probíhá HR, byla pozorována chlorosa listů, což souvisí s úbytkem chloroplastů. Chloroplasty jsou častým cílem efektorových molekul pocházejících z patogenů a není divu – v chloroplastech neprobíhá jen fotosyntéza, ale jsou i centrem biosyntézy signálních molekul (SA, MeJA, ABA) a dalších rostlinných hormonů a navíc zde probíhá produkce ROS. Bylo potvrzeno, že autofagie a degradace poškozených chloroplastů ve vakuole (Obr.4) vede k aktivaci zmíněných signálních molekul u zbylých, nepoškozených chloroplastů. Tato aktivace a její následné kroky jsou signifikantně ovlivněny osvětlením rostliny. Při nízké intenzitě světla se po rozpoznání patogenu rostlinou exprimuje významně nižší množství EDS1 (enhanced disease susceptibility 1 – protein s lipasovou aktivitou) a NPR1 (nonexpressor of PR genes 1). EDS1 spolu s PAD4 (phytoalexin deficient 4 – protein s lipasovou aktivitou) jsou zapojeny v odstraňování poškozených organel a také během časné odpovědi na patogen tyto dva proteiny spolu tvoří komplex, který je nezbytný pro akumulaci SA (Dong *et al.*, 2013, Louis *et al.*, 2012).



Obr. 4: Model předpokládané degradace chloroplastu ve vakuole postupným tvořením výběžků – stromulů. Za přispění ATG5 proteinů (autphagy related 5). RCB představuje fotosyntetický Rubisco protein obsažený ve váčcích. Váčky přecházejí do vakuoly, kde jsou degradovány.

Další velmi zvláštní strukturou, která se v rostlinných buňkách tvoří po působení biotického i abiotického stresu jsou **stromuly**. Jsou to trubičkovité výběžky z chloroplastů i jiných plastidů o šířce 50 nm (u huseníčku) až téměř 1µm. Jejich délka bývá od několika až do desítek mikrometrů. Jejich výskyt je častější a bývají i delší v buňkách s nižším počtem chloroplastů nebo v etiolovaných orgánech. Stromuly jsou pokryty oběma chloroplastovými membránami a jejich vnější strana se váže k rostlinnému aktinovému cytoskeletu. Pohyb stromulů je umožněn myosinovými motory XI (Hanson *et al.*, 2011). Při vzniku stromulů se uplatňuje FtsZ gen, což je prokaryotická obdoba tubulinu tvořící v plastidech vlákna (Martin *et al.*, 2009). Stromuly rostou z chloroplastů a mohou je propojovat mezi sebou ale i s jinými

organelami, např. trubicemi ER, plasmatickou membránou nebo jádrem. Tato propojení mohou sloužit k rychlejšímu přenosu signálů (jak chemických, tak i elektrických) během obranné odpovědi nejen v buňce, ale i mezi buňkami tím, že stromuly jsou nasměrovány přímo k plasmodesmatům (Kwok *et al.*, 2004). Stromuly jsou poměrně stabilní pohyblivé struktury. Vznikají po změnách redoxního stavu buněk, po tvorbě ROS, během symbiotických interakcí, po virové infekci, během zvýšené teploty, při autofágní degradaci plastidů, ale například i po aplikaci MeJA, ABA nebo prekursoru ethylenu - 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC). Po aplikaci SA stromuly naopak zanikají (Erickson *et al.*, 2014, Gray *et al.*, 2012, Mathur *et al.*, 2012).

Podobné výběžky jsou schopné vytvářet i další organely např. mitochondrie nebo peroxisomy, výběžky jsou potom nazývány **matrixuly** a **peroxuly**. Peroxuly se tvoří i zanikají velmi rychle např. poté, co v buňce vzroste množství ROS. U jádra ani vakuol nebyly podobné výběžky pozorovány téměř nikdy (Mathur *et al.*, 2012, Scott *et al.*, 2007).

Mitochondrie bývají cílem efektorových molekul například HopG1 z *Pseudomonas syringae*, efektor poškozuje funkci mitochondrií, což vede zatím nepoznaným mechanismem ke zvýšení hladiny ROS, zvýšení exprese PR1 u *A. thaliana*. Mitochondrie slouží ke snížení přebytečného množství ROS a bylo zjištěno, že se překvapivě spíše negativně podílejí na regulaci obranné odpovědi tím, že předcházejí přemrštěné autoimunitní reakci z přebytku ROS a RNS. Mitochondrie během svého vyřazení z funkce také přispívají k rozvoji PCD uvolněním cytochromu c v přítomnosti efektorové molekuly viktorinu nebo elicitoru harpinu. U živočichů se po uvolnění cytochromu c z mitochondrií aktivují kaspasy přímo zapojené v PCD. Podobný mechanismus se předpokládá i u rostlin. Mitochondrie a další organely se v buňce pohybují na dlouhé vzdálenosti podél aktinových filament a občas se zastaví v místě, kde je přítomen mikrotubulus, ale jak bylo zjištěno, kromě mitochondrií se organely zastavují i v nepřítomnosti mikrotubulů (Colombatti *et al.*, 2014, Hamada *et al.*, 2012).

Velmi významně se při obranné odpovědi uplatňuje transport váčků uvnitř buňky, jejich sekrece, ale i endocytosa. Do apoplastu buňky sekretují materiál na zesílení buněčné stěny, obranné proteiny a sekundární metabolity, popřípadě kalosu v místě papily, která vzniká v místě napadení houbovými patogeny. Transportu materiálu do místa průniku patogenu se účastní dvě nezávislé dráhy. První z nich je typická sekreční dráha, ve které je zapojen SNARE komplex (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), jehož součástí napomáhají uchycení váčků na plasmatickou membránu a také jejich exocytose. Součástí druhé dráhy je typický transportér xenobiotických látek – ABC-transportér (ATP-binding cassette transporter), kódovaný genem s označením *PEN 3* (Meyer *et al.*, 2009, Nielsen *et al.*, 2012).

PEN3 protein přesunuje do apoplastu například produkt genu *PEN2*, což je netypická myrosinasa (štěpí glukosinoláty na toxičtější produkty u rostlin čeledi *Brassicaceae*), obecně patřící do rodiny β -glukosidas. *PEN2* je fyziologicky lokalizována na povrchu peroxisomů.

β -glukosidas se v rostlinách vyskytuje velké množství a často nesou apoplastickou signální sekvenci. Některé z nich (*PYK10/BGLU23*) jsou součástí specifických **ER-tělísek** (ER bodies), které se při stresových situacích objevují v listech pouze u řádu *Capparales*. ER-tělíška jsou válcovitá nebo vřetenovitá útvary o délce kolem 10 μm a šířce asi 1 μm . Jde o deriváty ER vyskytující se v cytoplasmě, mají jednotkovou membránu a jsou často pokryta ribosomy. ER-tělíška se za běžných podmínek vyskytují v kořenech rostlin řádu *Capparales*.

V ER-tělískách se hromadí i obranné PR1 a PDF1.2. proteiny (produkty signalizace SA a MeJA po stresu) a při obranné reakci jsou ER-tělíska relokalizována po aktinových filamentech k plasmatické membráně a sekretována do apoplastu. β -glukosidasy z ER-tělísek se účastní syntézy fytoalexinů i štěpení indolových glukosinolatů na toxické produkty, navíc mají funkci i v metabolismu železa a při jeho nedostatku vychytávání kořeny (Nakano *et al.*, 2014).

2.3.1. Cytoskelet

Od doby, kdy N. K. Kolcov v roce 1903 poprvé poukázal na přítomnost a důležitost cytoskeletu při určování tvaru buňky, se neuvěřitelně zvýšilo množství poznatků o tom, ve kterých buněčných procesech je cytoskelet zapojen, stejně jako pochopení molekulárních mechanismů, které jsou podstatou těchto dějů. Spolu s tím se přirozeně posunul i pohled na cytoskelet od názoru, že je jakousi neměnnou kostrou buňky k představě lešení, které podléhá neustálým a velmi rychlým přestavbám podle momentálních potřeb buňky.

O mimořádné důležitosti svědčí i to, že proteiny tvořící jednotlivé složky cytoskeletu, ale i proteiny asociované s cytoskeletem, mají velmi konzervovanou strukturu u všech eukaryot a mutantní linie těchto proteinů jsou letální anebo vykazují výrazný fenotyp.

Vzhledem k tomu, že cytoskelet funguje v buňce jako systém dynamických vodících drah, nepřekvapuje, že je zapojen do většiny buněčných procesů. A nejde jen o procesy fyziologické, jako je například mitosa, cytokinese, určování tvaru buňky, buněčná polarita nebo doprava váčků, organel v buňce. Na cytoskeletu závisejí i reakce rostlin na podněty okolí, ať už se jedná o pohyby svěřacích buněk průduchů reagujících na vlhkost, ozáření a koncentraci CO₂ nebo otevírání iontových kanálů. Také reakce po setkání s patogenem mají na svém počátku významné změny cytoskeletu (Wasteneys *et al.*, 2004). Překvapivou informací je, že u živočichů jsou na mikrotubulárním cytoskeletu závislé i tak abstraktní procesy, jako je dlouhodobá paměť (Craddock *et al.*, 2012).

Cytoskelet rostlin vykazuje oproti živočišnému jednu velice diskutovanou odlišnost: jeho složkou údajně nejsou intermediární filamenta (Nick 2008).

Původní představa o cytoskeletu jako jedinečném eukaryotickém znaku se změnila ve chvíli, kdy byla u prokaryot nalezena analoga proteinů všech typů cytoskeletálních filament. (Shih *et al.*, 2006).

2.3.1.3. Mikrotubulární cytoskelet

Mikrotubuly jsou 25 nm široké duté válce, jejichž základní stavební jednotkou je tubulinový α/β heterodimer, kde se obě jednotky pojí nekovalentními vazbami. Heterodimery poskládané za sebou tvoří protofilamentum. Mikrotubulus pak tvoří 10-15 (typicky 13) protofilament paralelně poskládaných vedle sebe, na jednom konci spojených do tubulární struktury. Protofilamenta se k sobě skládají tak, že jejich α i β -tubulinové jednotky jsou vedle sebe, ne však úplně přesně, ale s nepatrným, 0,9 nm velkým posunem po délce.

Jeden konec mikrotubulu je tedy zakončen β -tubulinovými jednotkami a druhý pouze

α -tubulinovými jednotkami. To má svou funkci: α i β -tubulinové jednotky mají schopnost vázat GTP, ale pouze β -tubulin je schopen štěpit GTP za současného připojení α - konce α/β heterodimeru. Z tohoto důvodu se β -konec mikrotubulu označuje jako rychleji rostoucí – plus konec a α -konec mikrotubulu jako méně dynamický – minus konec. U rostlin se mikrotubuly svými minus konci kotví k mnoha buněčným organizačním centrům, což jsou komplexy obsahující třetí typ tubulinu – γ -tubulin a další proteiny například katanin. Tato centra se častěji nacházejí pod povrchem buňky, takže mikrotubuly rostou většinou směrem dovnitř (Valiron *et al.*, 2001).

Přirozenou vlastností mikrotubulů je jejich velká dynamičnost, mikrotubulus na jednom konci neustále dorůstá a na opačném disociuje; tato tzv. dynamická nestabilita mikrotubulů je modulována a regulována i mnoha proteiny asociovanými s mikrotubuly (MAP – microtubule-associated proteins).

O tom, zda bude plus konec mikrotubulu dorůstat či ne, rozhoduje přítomnost čepičky na koncovém β -tubulinu. Čepička sestává z tzv. +TIP proteinů (+tip interacting proteins) a β -tubulin, který se k ní váže je ve formě GTP (Dimitrov *et al.*, 2008).

Dynamiku mikrotubulů ovlivňuje významně i struktura samotného tubulinu.

Existuje mnoho isoform jak α - tak i β -tubulinu, jejich N-konec je velmi konzervovaný a rozdíly mezi jednotlivými isoformami najdeme v posledních asi dvaceti aminokyselinách C-konce proteinu (Westermann *et al.*, 2003). Například genom *A. thaliana* obsahuje šest genů pro α -tubulin a devět pro β -tubulin (Kopczak *et al.*, 1992, Snustad *et al.*, 1992). Obecně se má za to, že je několik isoform tubulinu exprimováno konstitutivně a exprese dalších je minoritní, závislá na rostlinném pletivu nebo okolních podmínkách. Jako příklad poslouží *A. thaliana*, kde se *TUA2* a většina dalších genů uvádí jako všeobecně exprimované, ale *TUA1* je popisován hlavně v pylu (Carpenter *et al.*, 1992) a zvýšení exprese *TUB9* bylo pozorováno po chladu a naopak exprese *TUB2* se po působení chladu snižovala (Chu *et al.*, 1993). U rostlin je výzkum na tomto poli poměrně na počátku, ale například medicínský výzkum odhalil, že jestliže je jeden isotyp TUB3 majoritní součástí mikrotubulů, jsou mnohem dynamičtější a naopak mutace v genu tohoto proteinu způsobuje vážná neurologická poškození. Isoforma proteinu TUB3 je přítomna hlavně v centrálním nervovém systému a účastní se jeho zrání a navíc i interakce s kinesinovými motorovými proteiny (Panda *et al.*, 1994, Tischfield *et al.*, 2011). Podobně bylo pozorováno u mouchy *Drosophila melanogaster*, že isotyp tubulinu $\beta 2$ se specificky podílí při zrání spermatocytů. Často jsou ale jednotlivé isotypy zaměnitelné a specifita se projevuje pouze u procesů spojených s rozmnožováním (Wilson *et al.*, 1997).

Dalším mechanismem, který reguluje chování mikrotubulů a zároveň zajišťuje větší robustnost celého mikrotubulárního cytoskeletu, jsou posttranslační modifikace tubulinů a jejich posttranslační alternativní sestřih. U rostlin byly zaznamenány tyto změny hlavně při ontogenetickém vývoji a patří sem: acetylace (α -tubulinu v pylu a listech kukuřice), která je poměrně rozšířená, polyglykosylace, polyglutamylace (ta je zapojena při interakci s kataninem, proteinem asociovaným s mikrotubuly, který způsobuje přerušování mikrotubulů), tyrosinylace (α -tubulinu v rašících pupenech *Vitis vinifera*) (Hammond *et al.*, 2008, Parrotta *et al.*, 2010). Rostlinné hormony – auxin a giberelin zvyšují tyrosinylaci α -tubulinu

u transverzálně uložených mikrotubulů (Duckett *et al.*, 1994). Zajímavé bylo zjištění, že inhibitory fosfatas a kinas způsobují reorganizaci mikrotubulů (Baskin *et al.*, 1997).

2.3.1.3.1. Proteiny asociované s mikrotubuly

Proteiny asociované s mikrotubuly (MAP) jsou nástrojem, který významně ovlivňuje dynamiku mikrotubulů. Společným rysem tradičně zmiňovaných MAP je jejich poměrně velká konzervovanost u eukaryot a dále přítomnost mikrotubulární vazebné domény. Hamada dělí MAP vyšších rostlin do dvou velkých skupin: MAP napomáhající skládání a rozpadu mikrotubulů a dále MAP umožňující skládání mikrotubulárních struktur a regulující funkce založené na mikrotubulech. (Hamada 2007)

MAP účastníci se nukleace - nukleační centra γ TuC jsou u rostlin rozložena difuzně v cytoplasmě na rozdíl od živočichů, kde existuje mikrotubuly organizující centrum (microtubule-organizing center – MTOC). Mechanismus nukleace je ale podobný, u všech eukaryot nalézáme v γ TuC: γ -tubulin a orthology proteinů Spc97 a Spc98 (Murata *et al.*, 2005). Do skupiny **MAP napomáhající prodlužování MT** patří proteinová rodina MAP215, ta je opět velmi dobře konzervovaná napříč eukaryoty a její členové usnadňují jak přiřazování, tak i oddělování tubulinových dimerů. U *A. thaliana* takto funguje protein MOR1 (microtubule organization 1) a nejen to, *mor1* mutanti mají poškozenou nejen tvorbu dělicího vřeténka, ale i cytokinesi a tvorbu fragmoplastu (Twell *et al.*, 2002).

Katanin je jediným známým zástupcem **MAP destabilizujících mikrotubuly** u rostlin, jedna jeho podjednotka má ATPasovou aktivitu a druhá se váže k heterodimeru tubulinu (Bouquin *et al.*, 2002). Obecným kandidátem na MAP, které spojují laterálně mikrotubuly je **MAP65**. Bylo ale zjištěno, že například MAP-65-3 funguje takto u *A. thaliana* jen během fázi dělení buňky a ne při interfázi, ale MAP-65-1 se objevuje i při interfázi, zatímco MAP-65-5 se váže pouze k transverzálním mikrotubulům (Muller *et al.*, 2004). Proteiny MAP65 v tabáku se nevážou k volnému tubulinu, ale pouze k mikrotubulům a to k C-konci tubulinu, mimoto bylo pozorováno, že protein MAP65 stabilizuje mikrotubuly a to i po chladovém stresu, kdy se normálně mikrotubuly rozpadají (Wicker-Planquart *et al.*, 2004).

Genom *A. thaliana* obsahuje 61 genů pro **kinesiny**. Funkce kinesinů nezahrnuje pouze transport organel, ale i organizaci mikrotubulárních struktur. Podrodina At1 kinesinů reguluje lokalizaci a fosforylaci MAPKKK kaskády při tvorbě fragmoplastu (Tanaka *et al.*, 2004). Kinesin ATK5 byl identifikován jako +TIP vázající se na prodlužující se konec mikrotubulu. Uvažuje se o tom, že tento protein je ekvivalentem pro dyneinové motory, které dvouděložným rostlinám chybí. (Ambrose *et al.*, 2005)

+TIP proteiny (+tip interacting proteins) se váží na rychle rostoucí (plus) konec mikrotubulu a jsou zapojeny ve vnitrobuněčném transportu, ve vazbě na kinetochor nebo na plasmatickou membránu například EB1, MAP200/MOR1, CLIP-170 nebo SPR1 (spiral 1, member of TOR/SPIRAL family), který se váže i po celé délce mikrotubulu, někdy v poraněných pletivech. Mutant *spr1* vykazuje pravotočivý spirální růst kořenů a etiolované hypokotyly. (Nakajima *et al.*, 2004)

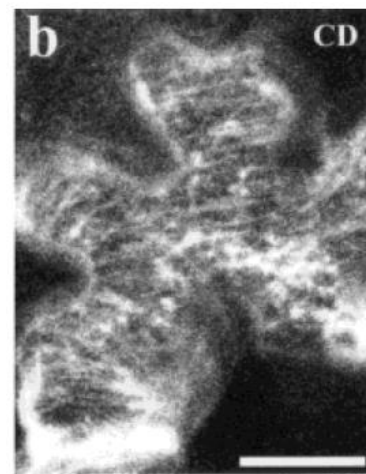
MAP vázající se na membrány byl objeven už v roce 1978 elektronovou mikroskopií. Hovořilo se o můstku, který váže kortikální MT k plasmatické membráně (Hardham *et al.*, 1978) a v roce 2001 bylo objeveno, že tímto proteinem je s největší pravděpodobností

fosfolipasa D δ (Gardiner *et al.*, 2001), která je u rostlin zapojena v signální dráze spouštějící se například při stresu ze zasolení nebo chladu. (Li *et al.*, 2009)

Původně bylo zjištěno, že chemické látky, které ovlivňují například aktinový cytoskelet, ovlivní do jisté míry i mikrotubulární síť (Collings *et al.*, 1998). Později byly nalezeny s cytoskeletem asociované proteiny, které reagují s oběma složkami cytoskeletu, **aktin vázající MAP:ARP2/3**, rodina kinesinů 14B, ale zřejmě i PLD δ .

U eukaryot se popisuje, že celé komplexy pretranslační RNA a řady dalších připojených proteinů jsou pomocí MT sítě přenášeny k místu translace. Kandidátem na funkci můstku mezi RNA granulemi a MT je kinesin-1 proteiny a první výsledky ukazují, že je tomu tak i u rostlin, kde u *A. thaliana* takto funguje protein SPR2/TOR1. Dalším **RNA-asociovaným MAP** proteinem je MFP (multifunctional protein), který váže jak RNA, tak i MT a je lokalizován na peroxisomech (Chuong *et al.*, 2005).

PB-ER (prolamin body-endoplasmatic reticulum) protein je dalším RNA vazebným proteinem, ale váže se nejen k mikrotubulům, ale i k aktinovým vláknům. EF-1a (elongation factor 1-a) reguluje translaci RNA i nukleaci MT a vzor, který vytváří po expresi GFP-EF-1a v buňkách listů bobu není typickým mikrotubulárním vzorem, ale zdá se, že jde spíše o jakousi frakci MT. (Obr. 5) (Moore *et al.*, 2000).

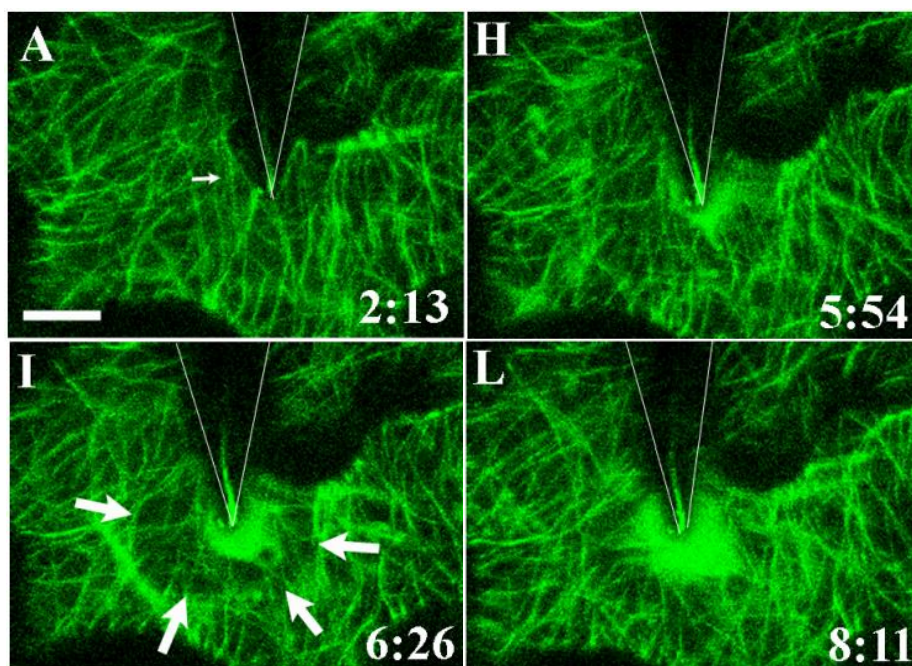


Obr. 5: Zvláštní uspořádání MAP proteinu. Epidermální buňka listu *Vicia faba* exprimující GFP-EF1- α , filamenta připomínají netypicky uspořádané mikrotubuly. Měřítka odpovídá 10 μ m (Moore *et al.*, 2000).

2.3.1.3.2. Zapojení mikrotubulárního cytoskeletu v obraně rostlin

Reorganizace mikrotubulárního cytoskeletu vymykající se běžné dynamice mikrotubulů byla popsána po mnoha druzích stresových faktorů, například mechanickém nebo osmotickém stresu, zranění a patogenech a je předmětem zkoumání, zda tato reorganizace nastává v rámci obranné reakce po rostlinných hormonech (auxiny, cytokininy, ET, ABA) (Ho *et al.*, 2009) nebo po jiných faktorech a nebo zda je to jev, který nastává poměrně často během obranné reakce, ale pouze v některých subcelulárních kompartmentech.

Poměrně dobře byla ale dokumentována počáteční, mechanická fáze obranné reakce v pokožkových listech *A. thaliana*. K imitaci houbové infekce byla použita mechanická stimulace buněk jehlou. Již během pěti minut bylo možné pozorovat shlukování MT kolem místa předpokládané infekce. (Obr. 6) (Hardham *et al.*, 2008).



Obr. 6: Reakce mikrotubulů na mechanickou stimulaci. Mikrotubulární marker TUA6-GFP v epidermálních listových buňkách *A. thaliana* umožnil vizualizovat shlukování kortikálních mikrotubulů pod místem mechanické stimulace buňky jehlou. Číslice udávají trvání stimulace v minutách. Měřítka odpovídá 10 μm (Hardham *et al.*, 2008).

MT cytoskelet hraje také roli krátce po percepci PAMP, konkrétně flg22, kdy se podílí na internalizaci, čili inaktivaci aktivního receptoru FLS2. MT fungují jako dráhy, po kterých se váčky s FLS2 pohybují (Robatzek *et al.*, 2006).

Děj, který může již bezprostředně souviset s úlohou MT při obranné reakci, popisuje Qiao. Bakteriální elicitor harpin zároveň zabraňuje polymeraci tubulinu a spouští expresi PR-1 proteinu, typického markeru obranné reakce (Qiao *et al.*, 2010).

Dobře je prozkoumána úloha mikrotubulů při solném stresu, kdy bylo zjištěno, že mikrotubuly se zapojují do odolnosti proti zasolení nepřímo přes proteiny asociované s mikrotubuly například SPIRAL1 (+TIP – MAP) nebo PFD3 a 5 (prefoldin 3 a 5), které napomáhají správnému skládání tubulinů po biosyntéze a mutanti netvořící tyto proteiny jsou zvýšeně citliví k NaCl, ale ne k jiným osmotikům (Rodriguez-Milla *et al.*, 2009). Jako velmi důležité se ukázalo propojení MT a plasmatické membrány pomocí PLD δ , která, jak se zdá, buď sama nebo s nějakými dalšími reakčními partnery (flotiliny nebo jim příbuzné proteiny vyskytující se v rostlinných cytoplasmatických mikrodoménách) reguluje připojení MT k plasmatické membráně (Gardiner *et al.*, 2001, Ho *et al.*, 2009, Marc *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 2012).

Fosfolipasa D δ je u huseníčku také zapojena v signalizaci, které se účastní MT během zasolení. Se zvýšenou odolností k solnému stresu je také spojena zvýšená exprese MAP65-1 proteinu, který spojuje laterálně MT. Ty svazkují a MT síť se takto stabilizuje. Aktivita MAP65-1 proteinu se zvyšuje po vazbě na PA, signální molekuly vznikající např. i činností PLD α 1 (Zhang *et al.*, 2012).

V mutantu *A. thaliana* – *sos1*, kde chybí Na^+/H^+ antiporter zvyšuje stabilizace MT toleranci k soli a naopak. Depolymerace MT vedla k otevření iontových kanálů a zvýšení koncentrace vápníkových iontů, což následně indukovalo vznik nové MT sítě (Wang *et al.*, 2011).

2.3.1.4. Aktinový cytoskelet

Aktinový cytoskelet patří k nejdynamičtějším součástem rostlinné buňky. Díky tomu se účastní mnoha fyziologických procesů, například transportu nukleových kyselin, váčků, organel, exocytosy, endocytosy, udržuje vnitrobuněčnou strukturu a její polaritu, uplatňuje se při prodlužování pylových láček i kořenů (Staiger *et al.*, 2000). Aktinová filamenta (AF) nerealizují všechny tyto funkce sama o sobě, ale komunikují s dalšími součástmi buňky pomocí aktin vazebných proteinů (ABP – actin binding protein), kterých je u rostlin zatím známo kolem sedmdesáti (Drobak *et al.*, 2004, Hussey *et al.*, 2006). Aktinová vlákna (F-aktin) ve skutečnosti tvoří jen malou část celkového aktinu v rostlinných buňkách, z velké části je přítomen jako monomerné jednotky (G-aktin), které mají velmi přibližně tvar kostky (o rozměrech 6,7 x 4,0 x 3,4 nm). Molekula aktinu sestává ze čtyř podjednotek, v jejichž centru je vázán ATP (adenosine triphosphate), který napomáhá aktinovým jednotkám polymerovat. Nejprve vznikají dimery až trimery, které se dále spojují. Tak je vytvořeno 7-9 nm široké, šroubovicovitě vinuté dvouvlákno, které má rychle rostoucí (+) konec (barbed end), tam se připojují nové jednotky G-aktinu, opačný (-) konec (pointed end) je naopak místem, kde jednotky ADP-aktinu disociují z vlákna (Hild *et al.*, 2010). Aktinové vlákno roste v průměru rychlostí 1,7 $\mu\text{m/s}$. Pro dynamiku aktinu a vazbu k ABP jsou významné postranlační modifikace, například fosforylace tyrosinových zbytků monomerů (Liu 2011, Staiger *et al.*, 2009).

Genom *A. thaliana* obsahuje osm funkčních genů pro aktin, rozdělených do dvou základních skupin: vegetativní geny (*ACT 2*, *7* a *8*) a reprodukční geny: (*ACT 1*, *3*, *4*, *11*, *12*) a dva pseudogeny (*ACT 5* a *9*), sekvence těchto genů vykazuje vysokou podobnost 93-97% (McCurdy *et al.*, 2001). Mutace v těchto genech jsou často letální nebo vykazují poměrně výrazný fenotyp, například mutace v *ACT2* vykazuje poruchy vzrostného vrcholu, při vyřazení *ACT7* mají rostliny porušený růst kořenů, sníženou klíčivost semen a poškozený růst nadzemních částí (Gilliland *et al.*, 2002, Gilliland *et al.*, 2003).

Nezbytnými regulačními nástroji aktinové dynamiky jsou ABP, které se tradičně dělí do pěti skupin podle funkce. Toto dělení není ale závazné a různí autoři používají i dělení jiná (Liu 2011).

Proteiny vázající monomerní aktin regulují polymeraci a depolymeraci aktinu. Patří sem např. **profiliny**, **ADF** (actin depolymerizing factor) neboli kofiliny, které se váží i k AF.

Mezi proteiny napomáhající zesíťování a svazkování mikrofilament patří: **fimbrin**, **gelsolin**, **villin**.

Čepičkující proteiny pokrývají konce filament a regulují přidávání G-aktinu k filamentu. Sem patří **CP** (capping protein) – čepičkující protein.

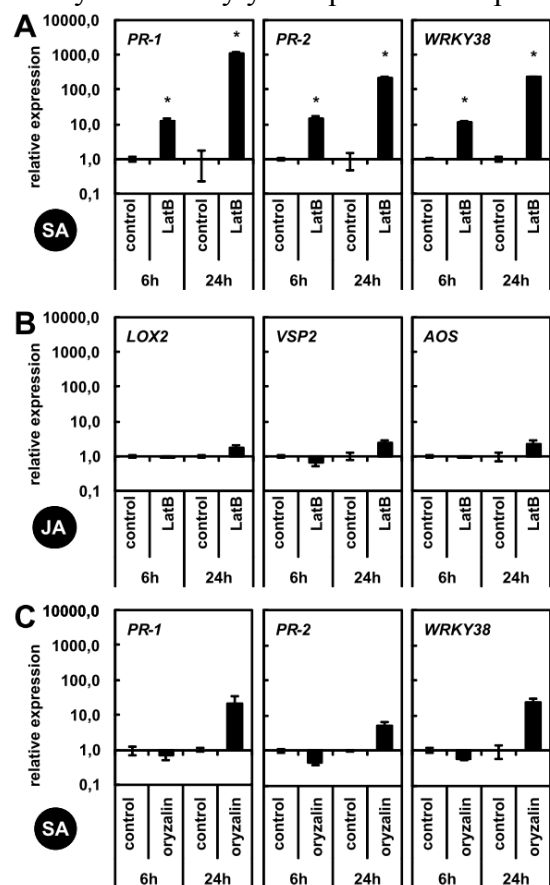
Podobně jako mikrotubuly mají i mikrofilamenta svá nukleační centra a proteiny, které iniciují tvorbu AF, u rostlin je znám **Arp2/3 komplex** a **forminy**.

Proteiny, které se váží laterálně k mikrofilamentům, regulují vazbu motorových proteinů nebo stabilizují aktinová filamenta. Sem patří **myosiny**, **kinesiny**, **ROP GTPasy** (Rho of plant). Vazebné domény pro aktin se vyskytují i u **fosfolipasy Dδ** a **β1** (Hussey 2004).

V posledních letech se začíná na dynamiku AF, a hlavně na jeho schopnost se v krátkém čase buď rozpadnout, nebo naopak výrazně polymerovat, pohlížet jako na klíčový faktor funkce aktinového cytoskeletu. V neošetřených buňkách hypokotylu u *A. thaliana* bylo sledováno chování kortikální sítě AF, vyskytovala se zde jemná a poměrně dynamická vlákna a širší svazky AF, které byly víceméně statické. Jemná vlákna se kompletně obnovovala během 30 s. Vlákna většinou nezanikají prostou depolymerací, ale byl pozorován jejich rozpad na menší části a poté buď jejich zánik, nebo z fragmentů začínala vyrůstat vlákna nová. Růst nových vláken byl pozorován i větvením vláken existujících. Výjimkou není ani ohýbání, kroucení nebo naopak narovnávání již existujících AF (Staiger *et al.*, 2009).

2.3.1.4.1. Zapojení aktinového cytoskeletu v obraně rostlin

Stejně jako mikrotubuly se i AF shromažďovala pod místem, kde byl mikrojehlou napodoben průnik patogenu do epidermální buňky listu *A. thaliana*, podobná situace byla pozorována i při infekci houbovým patogenem (Hardham *et al.*, 2007, Hardham *et al.*, 2008). Inhibitory polymerace aktinu zastavovaly typické přemístění jádra pod místo infekce i ukládání kalózy, buňky navíc nebyly schopné zabránit průniku i původně nepatogenních houbových patogenů.



Inhibitory polymerace aktinu vedly u huseníčku i ke zvýšení exprese PR-1, PR-2 a WRKY38 – markerů obranné reakce se zapojením signální dráhy SA (Obr.7A). (Matouskova *et al.*, 2014)

Obr.7: Vliv cytoskeletárních drog na expresi markerových genů SA a JA. 10 dnů staré rostlinky *A.thaliana*, pěstované v kapalném MS médiu byly ošetřeny latrunkulinem B (200nM) po dobu 6 a 24 hod (A, B), exprese markerových genů SA (PR1, PR2 a WRKY38) a JA (LOX2, VSP2 a AOS) byla hodnocena pomocí qPCR. (C) u rostlin ošetřených 20 μM oryzalinem (depolymerace mikrotubulů) po dobu 6 and 24 hod byla vyhodnocena exprese markerových genů SA. Kontrolní rostliny byly ošetřeny roztokem DMSO v MS médiu. Hodnoty představují průměry ± chybu průměru ze tří biologických opakování. Hvězdičky indikují statisticky významnou odlišnost ve srovnání s kontrolou (DMSO) (P<0,01, Studentův t test) (Matouskova *et al.*, 2014).

V místě infekce se shromažďují i ABP, například profilin, ROP-GTPasy, ale i proteiny rodiny PEN, které se zapojují při exocytose, váčky s obrannými proteiny a sekundárními metabolity jsou k plasmatické membráně dopravovány po vlákních AF. Důležitou úlohu hrají AF i při HR, která nastala v BY-2 buňkách 12 h po ošetření kryptogeinem (protein pocházející z oomycety *Phytophthora cryptogea*). Původně náhodně organizovaná tenká AF zesvazkovatela do silných provazců, které byly v buňkách transversálně orientovány (Higaki *et al.*, 2007, Higaki *et al.*, 2011).

Aktinová síť není zapojena jen do přímé obrany v místě průniku patogenu, ale mění se i během hodin signalizace v rámci obranné reakce rostliny. Spojitost byla nalezena mezi dynamikou aktinového cytoskeletu a fosfolipidovou signalizací. Když pomíneme již zmíněnou předpokládanou přímou vazbu PLD δ a β 1 k aktinu, bylo dokázáno, že produkt aktivity PLD, kyselina fosfatidová (PA), významně zasahuje do chování AF přes ABP. Při snížení množství PA v buňce přidáním n-butanolu, začala aktinová filamenta nejprve svazkovat a potom mizela (Motes *et al.*, 2005, Pleskot *et al.*, 2013). PA působí na aktinový cytoskelet například přes čepičkující protein – CP, který se váže na rychle rostoucí konce aktinových filament. Po zvýšení koncentrace PA v buňce, se CP na PA naváže a tím se uvolní rychle rostoucí konce vláken a aktin začne velmi rychle polymerovat (kvůli velkému množství přirozeně se vyskytujícího profilinu, který usnadňuje spontánní polymeraci) a množství vláken se zvyšuje. Hladina PA se zvyšuje po biotickém stresu, osmotickém a chladovém stresu a po zranění. Konkrétněji bylo zjištěno, že se tak děje např. po zvýšení hladiny ABA (Huang *et al.*, 2006, Hwang *et al.*, 2001). Existuje i opačný mechanismus kdy AF stimuluje aktivitu PLD β 1 a zpětnovazebně pak vznikající PA stimuluje AF k polymeraci (Pleskot *et al.*, 2010).

Do rezistence proti efektorovým proteinům z *Pseudomonas syringae* DC3000 je v *A. thaliana* zapojen i další ABP - aktin depolymerizační faktor 4 - ADF4 (actin depolymerizing factor) neboli kofilin. Rostliny při redukováném množství ADF4 nejsou schopny dostatečně rozvinout signalizaci, kde je zapojena SA a exprese markerového genu PR1 je výrazně snížena, stejně jako odolnost rostliny k patogenu a naopak se zvyšují projevy HR (Tian *et al.*, 2009). V SA signalizaci je zapojen i NPR1 protein, který tlumí projevy HR, takže nefunkčnost SA signalizace může vysvětlit zvýšený výskyt HR (Fu *et al.*, 2012). Přesný mechanismus průběhu procesu, kde je zapojen ADF4 není ještě dostatečně znám, avšak je znám alespoň způsob, jak ADF4 ovlivňuje aktinový cytoskelet. ADF4 se váže jak k monomernímu aktinu a zpomaluje jeho dynamiku tak i k AF, které dělí na menší fragmenty. Tyto fragmenty mohou zanikat nebo dát vznik dalším AF. Autoři zmiňují, že depolymerizace aktinu sama o sobě může být signálem, který spouští např. v živočišných buňkách aktivaci transkripčních faktorů (Tian *et al.*, 2009). Tento mechanismus nepotvrzuje Henty-Ridilla, která uvádí, že mutantní rostliny *adf4* měly signifikantně delší AF a také jejich životnost, aktivita fragmentace filament byla dvojnásobně snížena, cytoskelet tvořil více svazků AF a množství svazků filament bylo tedy relativně nižší než množství nsvazkovaných filament u WT *A. thaliana*, kde ADF4 přítomen je. To naznačuje, že ADF4 je nezbytný pro zvýšení dynamiky aktinového cytoskeletu a jeho polymeraci, která v prvních hodinách po rozpoznání PAMP vede ke zvýšení počtu aktinových filament (Henty-Ridilla *et al.*, 2014, Henty-Ridilla *et al.*, 2013, Henty *et al.*, 2011).

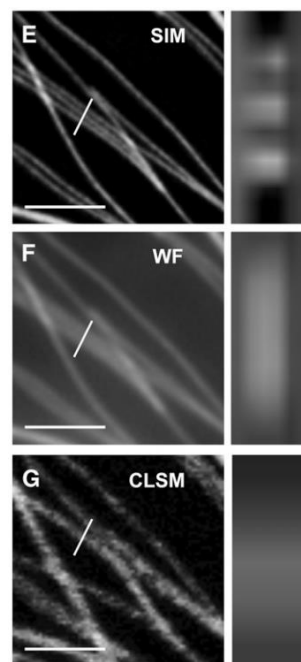
2.3.2. Techniky používané při vizualizaci cytoskeletu

Největším problémem, se kterým se potýká současný výzkum buněčných procesů, je vysoká dynamika a přechodná lokalizace těchto dějů v některé části buňky. Cytoskelet je typickým příkladem a je proto nutné používat speciální přístupy při jeho výzkumu. Jen s použitím zobrazení živých preparátů v reálném čase – live imagingu a nejmodernějších zobrazovacích technik je často možné vidět, například přechodnou depolymeraci mikrotubulů, která spustí celou kaskádu dějů vedoucích k fyziologické nebo i obranné reakci. Podmínkou zobrazování zkoumaných buněčných struktur v reálném čase je předchozí transformace rostlin vedoucí k přechodné nebo stabilní expresi zkoumaného proteinu fúzovaného s fluorescenčním proteinem, například GFP (green fluorescent protein z medúzy *Aequorea victoria*), RFP (red fluorescent protein z *Aequorea victoria*), mCherry (červeně emitující protein z *Discosoma sp.*) ap (Day *et al.*, 2009). Zobrazit takto značené proteiny je možné pomocí různých modifikací fluorescenčního mikroskopu se zdrojem světla (nejlépe laserovým) o definované vlnové délce. Každý fluorescenční protein absorbuje maximum fotonů při dané vlnové délce a vzápětí emituje světlo o vlnové délce o něco vyšší. Příprava genových konstruktů a transformace rostlin, které exprimují fluorescenčně značené proteiny pro sledování subcelulárních komponent, je pouze první krok. Dále je třeba se rozhodnout, jakou mikroskopovací techniku využít. Základem je **fluorescenční mikroskop**, kde ale výstupní obraz trpí tím, že kromě zaostřené roviny vidíme i světelný šum pocházející z oblastí nad nebo pod rovinou zaostření. Tento problém je možné eliminovat využitím **skenovacího konfokálního mikroskopu** (CLSM – confocal laser scanning microscopy), kde je šum pocházející z mimoohniskové roviny odfiltrován použitím konfokální clonky a můžeme tak pozorovat pouze ostrý obraz z ohniskové roviny. Tato technika využívá snímání obrazu po jednotlivých bodech a hodí se proto pro děje ne příliš rychlé (cytosolická lokalizace struktur) nebo děje, které mají jednoznačnou tendenci (úbytek vláken cytoskeletu homogenně v celé buňce) (Semwogerere *et al.*, 2008). Pro velmi rychlé děje (například sledování dynamiky cytoskeletu) se více využívá další typ konfokálního mikroskopu – **spinning disk microscopy** (SD), kde je konfokálního efektu dosaženo clonkami v podobě dvou rotujících kotoučů s otvory popř. mikročočkami a celé zorné pole je najednou snímáno vysokorychlostní CCD kamerou. Pro sledování procesů probíhajících na plasmatické membráně anebo těsně pod ní (do 100 nm) se výborně hodí tzv. **TIRF mikroskopie** (total internal reflection fluorescence microscopy) využívající odraz světla na hranici prostředí s různým indexem lomu (sklíčko – vodné prostředí vzorku) pomocí tzv. evanescentní vlny vznikající dopadem světla pod kritickým úhlem. Při maximálním možném zvětšení můžeme pomocí těchto tří typů mikroskopii dosáhnout rozlišení 300 nebo nejvýše 200 nm (Claxton *et al.*, 2011).

Zatím nejpokrokovějšími jsou v současnosti tzv. mikroskopické metody s velmi vysokým rozlišením (**super-resolution microscopy** – PALM, STORM, SIM, 4Pi, STED ap.) využívající technických, softwarových vylepšení nebo kombinovaných přístupů. Pro přiblížení popíši SIM mikroskopii (structured illumination microscopy), která se na rozdíl od mnoha jiných „super-resolution“ metod hodí pro zobrazení i velmi dynamických procesů: využívá se při ní dvou difrakčních mřížek, které se vůči sobě pohybují a vytvářejí tzv. moiré efekt.

Světlo procházející přes ně osvětluje postupně vzorek, obraz je snímán vysokorychlostní CCD kamerou a jednotlivé obrazy se potom softwarově skládají a upravují. Pomocí této techniky je možné dosáhnout rozlišení 50-100 nm (Komis *et al.*, 2014). Právě díky těmto pokročilým technikám můžeme přímo pozorovat rychlé procesy probíhající pouze na určitém místě v buňce (Obr 8).

Obr.8: Srovnání použití různých mikroskopických přístupů při zobrazení mikrotubulárního cytoskeletu v epidermálních buňkách *A. thaliana*. Snímek (F) ukazuje zobrazení pomocí klasického fluorescenčního mikroskopu, snímek (G) byl pořízen konfokálním skenovacím mikroskopem a při snímání obrázku (E) byla použita metoda s velmi vysokým rozlišením – SIM (structured illumination microscopy). Sloupec vpravo zobrazuje normalizované intenzity. Měřítka odpovídá 5 μm (Komis *et al.*, 2014).



2.3.3. Látky ovlivňující dynamiku cytoskeletu

Při studiu dynamiky cytoskeletu a hlavně dějů s dynamikou cytoskeletu spojených se osvědčilo používání chemických látek, které ovlivňují chování cytoskeletu – cytoskeletálních drog. Rozpad nebo naopak stabilizace cytoskeletu ovlivní procesy následné a pomůže určit význam a dobu zapojení cytoskeletu během fyziologických i patologických dějů. Vzhledem k důležitosti cytoskeletu jsou tyto látky často využívány jako léky, herbicidy nebo jedy.

Cytochalasiny je souborný název pro 24 sekundárních metabolitů příbuzné struktury pocházejících z různých plísní. Považují se za látky depolymerizující aktinový cytoskelet, ale ve skutečnosti se váží k rostoucím koncům aktinových vláken a brání připojení dalších aktinových podjednotek. Po ošetření mizí hlavně tenká aktinová vlákna, silnější svazky jsou naopak stabilizovány. Cytochalasiny zastavují cytoplasmatické proudění a pohyb organel už při koncentracích, kdy se rozpadá aktinový cytoskelet, tj. kolem 10 μM (Cooper 1987, Foissner *et al.*, 2007).

Latrunkuliny jsou látky makrolidové struktury, které byly izolovány z mořské houby *Latrunculia magnifica*. Aktinový cytoskelet destabilizují tím, že brání polymeraci filament vazbou na aktinové podjednotky. Latrunkuliny zabraňují polymeraci aktinového cytoskeletu už v nanomolárních (100-200 nM) koncentracích, ale teprve mikromolární (200 μM) koncentrace zastavují cytoplasmatické proudění a pohyb organel, což bylo považováno za typický projev funkce aktinového cytoskeletu. Působení latrunkulinů na cytoskelet je mnohem specifitější, než je tomu u cytochalasinů (Morton *et al.*, 2000, Spector *et al.*, 1989).

Faloidin je bicyklický heptapeptid pocházející z houby *Amanita phalloides*, který stabilizuje aktinová filamenta a vazbou na ně brání jejich depolymeraci. V rostlinné biologii se používá vázaný na fluorescenční rhodamin ke značení aktinového cytoskeletu (Cooper 1987).

Jasplakinolid je poněkud kontroverzní peptid izolovaný z mořské houby *Jaspis johnstonii*, který byl na základě *in vitro* studií považován za látku zvyšující polymeraci aktinu. Po použití *in vivo* se ale ukázalo, že při koncentraci 100 nM a krátké expozici opravdu aktinový

cytoskelet v rostlinách polymeruje, avšak delší působení a koncentrace kolem 400 nM způsobují úbytek jemných aktinových filament, a naopak shlukování větších svazků (Ou *et al.*, 2001).

Taxany jsou skupina přírodních i polosyntetických látek z *Taxus sp.*, kde jsou ve skutečnosti tvořeny endosymbiotickou houbou *Taxomyces sp.* žijící v kůře stromu, slouží především jako antineoplastikum (Stierle *et al.*, 1993). V biologii rostlin se využívá hlavně paclitaxel (taxol). Látka stabilizující mikrotubuly vazbou na pět aminokyselinových zbytků v β -tubulinu, paclitaxel, také indukuje polymeraci mikrotubulů (Das *et al.*, 2012).

Dinitroaniliny jsou herbicidy, mezi něž patří syntetický oryzalin (Surflan) nebo trifluralin. Ke stabilizaci mikrotubulů se využívá hlavně oryzalin, jehož mechanismus účinku spočívá ve snížení polymerace mikrotubulů. Oryzalin má podobný mechanismus účinku jako kolchicin (který je ale u rostlin méně účinný) a také se u rostlin využívá podobně jako kolchicin – k vyvolání polyploidie (Bajer *et al.*, 1986).

2.4. Produkce sekundárních metabolitů a obrana rostlin

Na rozdíl od všeobecně zastoupených primárních metabolitů odrážejí sekundární metabolity specifitu jednotlivých čeledí, ale často i rodů nebo druhů rostlin. Z chemického hlediska mohou být sekundární metabolity deriváty či degradační produkty primárního metabolismu, ale často je jejich struktura zcela nepodobná a mnohem komplikovanější, stejně jako metabolické dráhy, které k produkci sekundárních metabolitů vedou.

Není pochyb o tom, že sekundární metabolismus je rostlinným nástrojem, který odpovídá na nepříznivé vlivy okolí, kterými mohou být jak abiotické, tak i biotické stresové faktory v nejširším slova smyslu. Dalo by se říci, že sekundární metabolity jsou hlavním informačním nástrojem v ekologických interakcích rostlin (Bourgaud *et al.*, 2001). Tohoto poznatku se využívá při snaze zvýšit přirozenou produkci sekundárních metabolitů, které jsou lidskému zdraví prospěšné. Jestliže pohlížíme na produkci sekundárních metabolitů rostlin jako na odpověď jejich imunitního systému a uvědomíme si jejich dalekosáhlý dopad na lidské zdraví, nabízí se otázka, do jaké míry jsou si vlastně imunitní systémy a biochemické procesy lidí a rostlin podobné, a jak by se tento fakt mohl využít k lepšímu pochopení procesů probíhajících u obou zmíněných skupin organismů.

2.4.1. Charakteristika *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Huseníček rolní – *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. z čeledi *Brassicaceae* a řádu *Capparales* je jednoletá až ozimá bylina s přízemní listovou růžicí. Lodyha přímá a často větvená, dorůstající výšky 5-30 cm. Listy přízemní růžice (rosety) jsou obkopynaté, celokrajné či oddáleně zubaté, v jejich odění jsou přítomny i trojramenné chlupy. Úzce eliptické lodyžní listy přisedají zúženou bází. Květy skládají hrozen. Kališní lístky jsou žlutozelené s často nafialovělou špičkou, korunní lístky 2-4 mm dlouhé a bílé. Plodem jsou šikmo od lodyhy odstávající šešule.

Celkové rozšíření druhu zaujímá celou Evropu s výjimkou nejsevernějších oblastí. Huseníček však roste i ve střední Asii, na Kavkazu, na pobřeží Malé Asie a v severní a východní Africe. Druhotně pak roste v Číně, Japonsku, jižní Africe, Severní Americe a v Austrálii.

V ČR se druh hojně vyskytuje v termofytiku a mezofytiku na přirozených i druhotných stanovištích. Méně častý je v oblastech s karbonátovým podložím a v oreofytiku (zde zavlékán na antropogenně ovlivněná stanoviště).

Huseníček rolní roste na polích, okrajích cest a mezích, úhorech, v okolí železnic a na skalnatých svazích. Je druhem iniciálních sukcesních stádií. Kvete od dubna do října (Dostál *et al.*, 1989).

Nejpoužívanější modelovou rostlinou ve výzkumu je *A. thaliana* z několika důvodů: především, její malý (cca 142 milionů párů bází v haploidním genomu) osekvenovaný genom obsahuje velmi málo repetitivních sekvencí, a proto se molekulárně-genetické manipulace s tímto organismem snadno plánují a později i kontrolují. Navíc snadné genetické manipulaci napomáhá i to, že rostlina má vegetační dobu v řádech týdnů (efemerní rostlina), takže získání nových generací rostlin není tak zdlouhavé, jako je tomu například u tabáku. *A. thaliana* je schopna samoopylení (autogamie), což umožňuje snazší manipulaci během segregace a selekce rostlin po transformaci nebo křížení. Sekvenace genomu huseníčku odhalily asi 26 tisíc strukturních genů.

Huseníček patří do čeledi *Brassicaceae*, která zahrnuje mnoho hospodářsky důležitých plodin: řepka olejka, hořčice, brukvovitá zelenina. Rozhodla jsem se proto podrobněji se zaměřit na sekundární metabolismus druhu *A.thaliana*, který je překvapivý jak množstvím, tak i šíří sekundárních metabolitů.

2.4.2. Sekundární metabolismus *Arabidopsis thaliana* a jeho zapojení v obraně

Ačkoliv se chemická charakteristika sekundárních metabolitů rozvíjí v posledních 200 letech, lidé jim věnují pozornost od nepaměti pro jejich výrazné fyziologické účinky. I když obsah těchto látek bývá v rostlině menší než 1% celkového obsahu uhlíkatých látek, má až 25% léčiv svůj chemický původ v přirozeně se vyskytujících sekundárních metabolitech. Novější pohled chápe sekundární látky především jako nástroje interakce rostlin s patogeny (fytoalexiny) nebo ostatními rostlinami (metabolity zabraňující klíčení v alelopatických interakcích) popřípadě vyššími živočichy (látky snižující stravitelnost rostlinné hmoty) nebo i fyzikálními vlivy (ochrana před UV zářením). Všeobecně se dělí sekundární metabolity vyšších rostlin do tří hlavních skupin podle biosyntetických drah: fenolické látky, alkaloidy, terpenoidy a steroidy.(Bourgaud *et al.*, 2001)

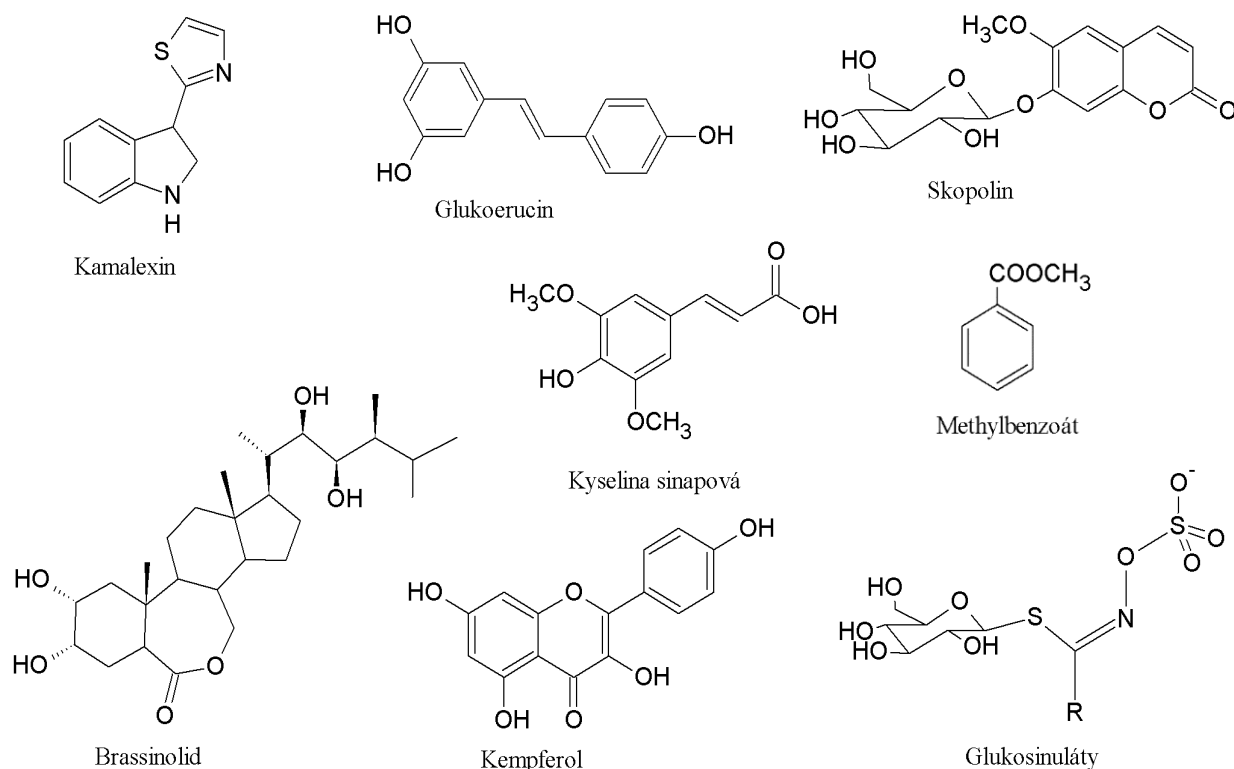
A. thaliana obsahuje asi 170 sekundárních metabolitů všech skupin, jejich přehled a předpokládaná funkce je v následující tabulce.

Skupina sekundárních metabolitů	Počet struktur	Předpokládaná funkce
indolové látky i se sírou	10	obrana proti patogenům
glukosinoláty	35	obrana proti patogenům a herbivorům
fenylpropanoidy	20	ochrana proti patogenům (?) a UV záření
benzenoidy	25	obrana proti patogenům(?), atraktant opylovačů (?)

flavonoidy	15	ochrana proti UV záření, auxinový transport, udržování semen v dormantním stavu, ochrana proti patogenům (?)
terpeny	50	ochrana proti herbivorům a patogenům(?), rezistence k oxidativnímu stresu(?)
deriváty mastných kyselin	15	ochrana proti patogenům (?), signalizace těkavými látkami

Obr. 9: Přehled a předpokládaná funkce hlavních skupin sekundárních metabolitů u *Arabidopsis thaliana*, převzato (D'Auria *et al.*, 2005).

Čeď Brassicaceae je poměrně specifická a poněkud uzavřená skupina, co se týká obsahových látek, navíc tvoří podstatnou část naší běžné stravy (křen, hořčice, rukola, řeřicha, brukvovitá zelenina – zelí, kapusta, ředkve, kedluben, květák, brokolice atd., lichořeřišnice, lžičník), takže i když obsahové látky této čeledi nemají tak výrazné fyziologické účinky jako jiné taxony, naše zdraví ovlivňují výrazněji právě s ohledem na přijímané množství.



Obr. 10: Příklady sekundárních metabolitů přítomných v *A.thaliana*

2.4.2.1. Látky obsahující dusík

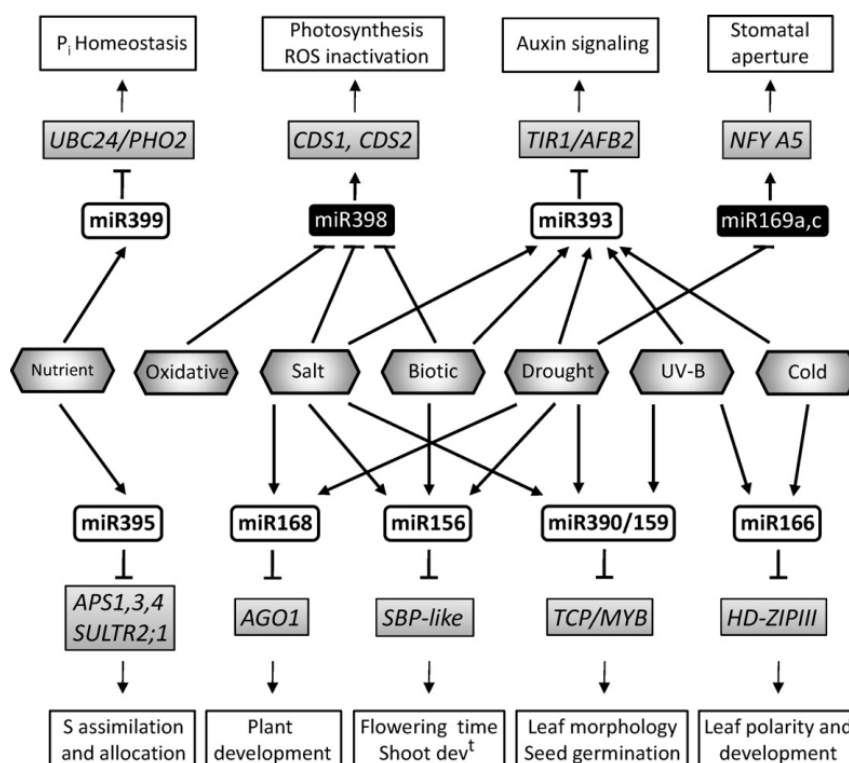
Kamalexin (Obr. 10) – indolová struktura s obsahem síry patří k fytoalexinům, které produkuje *A. thaliana* jako reakci na napadení patogenem a na abiotický stres, v dané čeledi známe podobných struktur s obrannou funkcí asi třicet. Mezi nejznámější patří kaulilexin C

nebo averlexin (Pedras *et al.*, 2000). Biosyntéza těchto látek je velmi blízká syntéze indolyloctové kyseliny – rostlinného hormonu auxinu s výraznou úlohou ve vývoji a signalizaci u rostlin. Kamalexin inhibuje růst biotrofních patogenů, zatímco mutant *pad3* (PAD3 je cytochrom P450) poškozený v biosyntéze kamalexinu nezastavoval růst biotrofních patogenů, ale zasahoval do růstu některých nekrotrofů, kteří ovlivněni nebyly. Předpokládá se proto nepřímá, výstražná funkce kamalexinu v obraně, a nebo, účinek až jeho rozkladných produktů vznikajících při poškození buněk. Potvrzeno ale bylo, že přítomnost kamalexinu je po abiotickém stresu nutná k tvorbě reaktivních kyslíkových forem a rozvoji programované buněčné smrti (Kliebenstein 2004).

Klasické alkaloidní struktury nebyly zatím u *A. thaliana* zaznamenány, ale u jiných taxonů čeledi byly popsány tropanové alkaloidy například kochlearin, který svou strukturou připomíná kokain, avšak takový účinek nebyl u lžičníku lékařského (*Cochlearia officinalis*) pozorován (lidově se používá pro svůj vysoký obsah vitamínu C, proti paradentóze, k podpoře chuti k jídlu a stimulaci tvorby žluči) (Brock *et al.*, 2006).

Podobnou biosyntetickou dráhu jako indolové struktury mají některé nejtypičtější sekundární metabolity mnoha čeledí řádu *Capparales* – glukosinoláty.

Molekula glukosinolátů (syn. thioglykosidy) je tvořena cukernou složkou (většinou se jedná o β -D-glukosu, resp. β -thioglukosu) a aglykonem, kterým je anion sulfonovaného oximu v poloze trans vzhledem k postrannímu řetězci -R a v poloze cis k thioglukosidovému zbytku. Postranní řetězec bývá buď alifatický, aromatický, indolové struktury nebo jde o sirnou sloučeninu (Obr. 10) (Velíšek *et al.*, 2009). V huseníčku bylo detekováno 36 glukosinolátových struktur, z nichž jsou nejhojněji zastoupeny struktury odvozené od methioninu například glucoiberberin, glucoerucin (Obr. 10) nebo glucoberberoin (Reichelt *et al.*, 2002). Glukosinoláty hrají roli v obraně proti patogenům a herbivorům. Glukosinolátový derivát 4-metylsulfinylisothiokyanát (4-MSOITC) inhibuje *in vitro* růst většiny známých biotrofních patogenů, ale příliš neúčinkuje na nekrotrofní patogeny, zatímco *in vivo* experimenty prokázaly, že růst biotrofních patogenů inhibován nebyl, ale ukázala se částečná inhibice některých nekrotrofů (Koenraad *et al.*, 2001). Indolové glukosinoláty (glukobrassicin) jsou indukovatelné biotickým stresem, jejich biosyntetická dráha je velmi blízká dráze auxinu a vnější podmínky mohou přesměrovat signalizaci a rozhodnout o tom, zda bude vznikat auxin a následně se budou více exprimovat geny závislé na auxinu nebo geny zapojené do biosyntézy indolových glukosinolátů a fytoalexinu kamalexinu. Navíc byla objevena i regulace na úrovni genů odpovídajících na auxin. Zvýšená funkce ARF (auxin response factor), transkripčního faktoru aktivovaného auxinem, potlačuje biosyntézu glukosinolátů a naopak, po snížení exprese ARF pomocí miRNA393 se hladina glukosinolátů zvyšuje a projevy genů zapojených v auxinové dráze jsou inhibovány, stejně jako dráha vedoucí k biosyntéze kamalexinu (Navarro *et al.*, 2006, Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011 b). Zpočátku se mělo za to, že různé druhy malých RNA – sRNA (např. miRNA, siRNA, trans-acting siRNA, nat-siRNA) se zapojují hlavně v obraně proti virům. Dnes víme, že umlčování strukturálních genů pomocí sRNA je zapojeno při signalizaci po působení biotického i abiotického stresu, stejně jako do většiny vývojových procesů. (Obr. 11) (Kruszka *et al.*, 2012).



Obr.11: Schematické znázornění zapojení některých miRNA do signálních reakcí při abiotickém i biotickém stresu (Kruszka *et al.*, 2012).

Bylo zjištěno, že syntéza methioninových glukosinolátů u *A. thaliana* je regulována hlavně třemi transkripčními faktory MYB 28, 29 a 76. Jejich exprese je podmíněna zraněním (všechny) a přítomností kyseliny jasmonové (MYB29), biosyntézu indolových glukosinolátů řídí TF MYB51. (Schweizer *et al.*, 2013) Různé transkripční faktory řídí biosyntetické kroky u glukosinolátů v různých místech v rostlině, hlavně v buňkách podél cévních svazků. Z toho můžeme usuzovat na jejich zapojení v systémové obraně proti patogenům a herbivorům pomocí indukce dosud neznámé signální molekuly. (Sonderby *et al.*, 2010) Obecně se množství glukosinolátů u rostlin zvyšuje po napadení a také s postupujícím stářím rostliny.

Naopak transkripční faktor MYC2, který je regulovaný m.j. také jasmonáty, inhibuje biosyntetickou dráhu vedoucí k syntéze kamalexinu i jiných glukosinolátů a stimuluje tvorbu flavonoidů, ale neovlivňuje zřejmě tvorbu auxinu (IAA), která se zvyšuje po působení JA jiným mechanismem než přes MYC2. TF MYC2, pomáhá zvyšovat toleranci k oxidačnímu stresu a může to být mechanismem zvýšené tvorby flavonoidů antokyaninů, tokoferolu nebo recyklace askorbátů. Flavonoidy také inhibují metabolismus auxinu. (Dombrecht *et al.*, 2007, Zheng *et al.*, 2012)

Během poškození rostlinného pletiva se začne z tělísek v idioblastech pletiva uvolňovat myrosinasa (EC 3.2.3.1), enzym s thioglukosidasovou aktivitou, který rozkládá glukosinoláty na isothiokyanáty a nitrily, často látky těkavé a toxicitější než glukosinoláty.

Isothiokyanáty, látky s kumulovaným systémem dvojných vazeb (R-N=C=S), se nazývají často také hořčičnými oleji, chrání rostliny před herbivory, uvolňují se i po ošetření herbicidy (Vercammen *et al.*, 2001).

U glukosinolátů a mnohem více u jejich rozkladných produktů – isothiokyanátů – byl prokázán protektivní efekt proti rakovině plic, žaludku, tlustého střeva, prsu, močového

měchýře a prostaty. Podstatou jejich mechanismu účinku je indukce nebo inhibice enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik (cytochrom P450, NAD(P)H: chinon-oxidoreduktázy, glutathion-S-transferázy, uridin 5-difosfátu, glukoronosyl-transferázy, epoxid-hydrolázy, ferritinu, γ -glutamátu, cystein-ligázy a katalázy), inhibice růstu tumorů a jeho prokrvení a indukce apoptózy (Traka *et al.*, 2009).

2.4.2.2. Fenylpropanoidy a benzenoidy

Prekursorem pro biosyntézu těchto látek je fenylalanin a u *Arabidopsis thaliana* můžeme najít hlavně deriváty skořicové kyseliny: sinapoyl cholin nebo kumarinový derivát skopolin (Obr. 10). Skopolin i jeho aglykon, skopoletin, se také považují za fytoalexiny, protože inhibují klíčení spor *Sclerotinia sclerotiorum*, některých druhů *Fusarium sp.* a dalších. Byla zjištěna i úloha skopoletinu v abiotickém stresu, může totiž chelatovat železo a pomáhat tak jeho netoxickému skladování v buňce. Sekrece skopolinu a jeho externí konverze na skopoletin (pomocí exocytovaných β -glukosidas) kořenovými buňkami napomáhá při vychytávání železa z půdy. Většina z těchto látek je zapojena v ochraně rostliny proti UV záření a také negativně ovlivňují biosyntézu auxinu (Nakano *et al.*, 2014).

Do skupiny benzenoidů patří další významná signální sloučenina – kyselina salicylová, která bývá rovnoměrně distribuovaná v celé rostlině, zatímco další benzenoidní struktura – kyselina syringová je přítomna hlavně v kořenech a kyselina vanilinová v květenstvích (Rohde *et al.*, 2004). Kyselina salicylová – signální molekula spouštějící expresi obranných PR1 proteinů (pathogen-related1) je během obrany syntetizována dráhou přes ICS (isochorismate synthase) a zapojuje se v lokální obranné reakci i SAR (systemic acquired reaction – systémově získaná rezistence), zatímco těkavý metylsalicylát i metylbenzoát (Obr. 10), který je považován za systémově přenášený signál, vzniká paralelní dráhou se zapojením PAL (phenylalanine ammonia lyase) a tato dráha dává vznik širokému spektru fenylpropanoidů, které se účastní i stavby buněčné stěny. (Van Poecke *et al.*, 2001)

2.4.2.3. Polyketidy: flavonoidy

Polyketidy jsou látky velmi rozšířené například u hub, jejich podskupina – flavonoidy patří k největší skupině polyketidů a jsou syntetizovány z malonyl-CoA přes dráhu chalkonsyntasy. Flavonoly, největší skupina flavonoidů u *Arabidopsis thaliana*, chrání rostlinu před UV zářením systémem konjugovaných dvojných vazeb. Po ozáření se hromadí hlavně glykosidy kempferolu (Obr. 10) a kvercetin a to nejen v nadzemní části hlavně mladších rostlin, ale i v kořenech (Veit *et al.*, 1999). Flavonoly zasahují do hormonální rovnováhy *A. thaliana* tím, že inhibují polární, basipetální transport auxinu a tím i růst. Zjištěným mechanismem účinku je inhibice některých proteinkinás, fosfolipasy A2 a fosfodiesteras. Flavonoidy hrají roli i v symbiotických interakcích (Fox *et al.*, 2001).

Na stupni ozáření závisí také produkce dalších flavonoidů – barevných antokyanů.

U *A. thaliana* je to kyanidinový derivát. Protoantokyanidiny neboli kondenzované tanniny regulují v semenech dormanci a délku života a podílejí se na ochraně proti patogenům (Debeaujon *et al.*, 2003).

Pro lidské zdraví mají flavonoidní struktury z čeledi *Brassicaceae* zásadní význam hlavně z důvodu jejich hojného příjmu potravou. Nejčastěji sledovaným flavonoidem je kvercetin z brokolice, ale flavonoidy se nacházejí ve velkém množství u všech zástupců čeledi.

Flavonoidy působí protizánětlivě, antimikrobiálně, protialergicky, ale jejich hlavním přínosem je antioxidační působení, které se pozitivně projevuje hlavně u aterosklerotických projevů, karcinomů, neurodegenerativních onemocnění a stárnutí (Cartea *et al.*, 2011).

2.4.2.4. Terpeny, deriváty mastných kyselin a steroidy

Po poškození se z *A. thaliana* uvolňuje směs těkavých monoterpenů (kořeny) a seskviterpenů (nadzemní části) : α -pinen, limonen, myrcen, ocimen ap., přítomny jsou i netěkavé triterpeny (Tholl *et al.*, 2005). U monoterpenů se předpokládá ochranná funkce proti reaktivním formám kyslíku.

Z látek lipidové povahy je zaznamenána přítomnost hlavně ochranných povrchových vosků a suberinů a také oxilipinů se signalizační funkcí.

Podobnou biosyntetickou dráhu jako terpeny mají rostlinné steroidní struktury. V *A. thaliana* se z kampesterolu a cholesterolu odvozují brassinosteroidy, látky se signalizační funkcí. Nejvýraznější účinek mají brassinolid (Obr. 10) a kastasteron, jejich účinek v rostlině začíná vazbou na receptorový komplex (BRI1 a BAK1) lokalizovaný vně plasmatické membrány, přes další signalizační kroky způsobují elongaci, dělení buněk a také jejich diferenciaci. Navíc u mutantů se sníženou produkcí brassinosteroidů bylo zjištěno menší množství cévních svazků. BRI1 receptor patří do skupiny asi 200 LRR-RLK receptorů (leucin-rich repeat receptor-like kinase), které se podílejí také na percepci při biotickém stresu (Cheon *et al.*, 2010, Vert *et al.*, 2005).

Geny, které jsou regulovány brassinosteroidy, ovlivňují složení buněčné stěny, chování cytoskeletu a syntézu hormonů. Brassinosteroidy zvyšují odolnost proti zvýšené i snížené teplotě, suchu, zasolení, patogenům, a to hlavně regulací a propojením s ostatními signálními molekulami v rostlině. Jejich interakce s auxinem, gibereliny, etylenem, kyselinou abscisovou a jasmonovou je známá spíše kvůli regulaci růstových a vývojových procesů. Za standardních podmínek zvyšují brassinosteroidy hladinu etylenu a kyseliny jasmonové a u nižších rostlin bylo popsáno zvýšení hladiny kyseliny abscisové po brassinosteroidech při stresu, zatímco kyselina abscisová inhibuje brassinosteroidovou signalizaci. Přídavek brassinosteroidů zvyšoval toleranci *A. thaliana* k solnému i tepelnému stresu. Také se ukazuje, že brassinosteroidy nezávisle na NPR1 (nonexpressor of pathogen-related genes1) indukují expresi SA-responzivních genů *PR-1* a *WRKY70* (Divi *et al.*, 2010).

Steroidní struktura brassinosteroidů působí i na lidský organismus, a to svým anabolickým efektem (zvyšují množství svalových vláken), ale nepůsobí, jako je tomu u ostatních steroidů, přes receptory umístěné v jádře, nýbrž přes povrchové receptory vně buněk. Navíc bylo prokázáno, že brassinosteroidy inhibují růst některých rakovinných buněk, a to bez ovlivnění buněk normálních (Esposito *et al.*, 2011).

2.4.3. Produkce sekundárních metabolitů explantátovými kulturami *in vitro*

V posledních dvaceti letech byly vkládány velké naděje do produkce sekundárních metabolitů pomocí explantátových kultur. První definice pochází od Bauera: „Za explantát je považován každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, který je vytržený z korelačních vztahů k celku a je pěstován v umělých podmínkách“ (Bauer 1939). Známe mnoho typů explantátových rostlinných kultur, nejčastěji využívané jsou kořenové, kalusové nebo buněčné. Buňky těchto kultur jsou více či spíše méně diferencované díky specifickému složení media. Nediferencované – kmenové buňky se v rostlině vyskytují v apikálním meristému jak nadzemní části, tak i kořene, ale najdeme je i difuzně rozetě v jiných pletivech. Jsou rostlinou udržovány v nediferencovaném stavu pomocí hormonů a jiných chemických signálů. Bylo zjištěno, že zdánlivě neorganizovaná kalusová hmota má strukturu nejpodobnější asi kořeni (Sugimoto *et al.*, 2010).

Základem pro odvození *in vitro* kultur je použití správného poměru rostlinných hormonů auxinu a cytokininu (někdy i giberelinů) pro udržení rostliny v dediferencovaném stavu. Poměr hormonů (i konkrétní forma auxinů nebo cytokininů) má vliv právě i na složení a množství sekundárních metabolitů. Každý rostlinný druh má své specifické nároky na množství daného hormonu, ale obecně platí, že v jistém smyslu působí auxiny a cytokiny antagonisticky. Při výrazně vyšším poměru cytokininu vůči auxinu se preferenčně vyvíjejí nadzemní části rostliny, vyšší koncentrace auxinu naopak zvýhodňuje vývoj kořenů. Nepatrně vyšší poměr auxinu vůči cytokininu způsobuje dediferenciaci rostlinných buněk a vyvíjí se kalus (Skoog *et al.*, 1957). U jednotlivých taxonů je tedy potřeba zjistit vliv poměru rostlinných hormonů na dediferenciaci i složení metabolitů víceméně experimentálně.

Rostlinné *in vitro* kultury vykazují oproti pěstovaným rostlinám několik výhod: rostlinné kultury rostou v kontrolovaných podmínkách, to znamená, že nejsou ovlivňovány nežádoucími mikroorganismy a podmínky se mohou podle momentální potřeby měnit. V kratším čase poskytují více rostlinné biomasy a tím i sekundárních produktů než intaktní rostliny. Díky totipotenci rostlinných buněk je méně diferencovaná buňka rostlinné kultury schopna přepnout do prakticky jakéhokoli metabolického stavu, ke kterému má její genom potenciál. K elicitaci – vyvolání zvýšené produkce žádaných rostlinných sekundárních metabolitů - se využívají abiotické stresové faktory, rostlinné hormony, signální molekuly zapojené v obranných drahách a nebo molekulárně-genetické přístupy.

Postupem času se ale ukázalo, že například produkci složitých molekul alkaloidů není možné u rostlinných kultur dovést do zdárného konce, protože metabolické dráhy jsou příliš složité a často vázané na určité morfologické struktury rostliny. Cytostatikum paklitaxel je jednou z mála složitých struktur, které lze pomocí buněčné kultury tisu (*Taxus sp.*) vyprodukovat v dostatečném množství, právě indukci rostlinnou signální molekulou – kyselinou jasmonovou (Tabata 2006).

Explantátové kultury čeledi *Brassicaceae* mohou poskytnout ideální materiál pro produkci flavonoidních struktur s antioxidačním účinkem. Je možné využít výhod řízeného, rychlého nárůstu biomasy a zároveň je rostlinná kultura schopná syntetizovat celé, relativně jednoduché molekuly flavonoidů, které pak mohou být z kultur extrahovány pro farmaceutické účely.

Jedním z úspěšných pokusů bylo zvýšení množství fenolických struktur u *in vitro* kultur zelí (*Brassica oleracea* var. *costata*) pomocí specifického poměru benzylaminopurinu (cytokinin) a kyseliny naftyloctové (auxin) (Taviera *et al.*, 2009).

Glukosinoláty se v intaktních rostlinách čeledi *Brassicaceae* tvoří po mechanickém poškození, které v rostlinách spouští signalizační dráhu kyseliny jasmonové. Toho bylo využito pro zvýšení obsahu indolových glukosinolátů v embryonálních kulturách rodu *Brassica*, kde se po ošetření kyselinou jasmonovou zvýšil obsah těchto látek až sedmkrát (Möllers *et al.*, 1999).

3. Cíle disertační práce:

1. Prostudovat úlohu cytoskeletu v časné obranné reakci rostlin.
Na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* budou s použitím transgenních rostlin s fluorescenčně značenými složkami cytoskeletu sledovány časné změny aktinového cytoskeletu jako odezva na stres. Pro zjištění role aktinové sítě při odezvě na biotický stres a jejich účasti v signálních drahách budou využity cytoskeletální drogy. K vyvolání stresové odpovědi budou použity signální molekuly - kyselina salicylová, kyselina fosfatidová a benzothiadiazol. Získané výsledky těchto experimentů *in vivo* budou hodnoceny pomocí obrazové analýzy a statisticky zpracovány.
2. Studovat přímé interakce fosfolipázy D s cytoskeletem.
Za použití molekulárně-biologických metod bude studována lokalizace fosfolipasy D v buňce a přímá interakce fosfolipasy D a cytoskeletem *in vivo*, popřípadě bude studována tato interakce po působení signálních molekul.
3. Studovat úlohu fosfolipasy D a mikrotubulů během abiotického stresu (solného). Získané výsledky těchto experimentů *in vivo* budou hodnoceny pomocí obrazové analýzy a statisticky zpracovány.
4. Hodnotit produkci sekundárních metabolitů *Arabidopsis thaliana* jako výsledek stresové odpovědi. Signální molekuly kyselina salicylová a inhibitor kyseliny fosfatidové budou aplikovány na rostliny huseníčku a poté budou v listech analyzovány indukované sekundární metabolity s využitím hmotnostní spektrometrie.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

Použité laboratorní přístroje a chemikálie jsou uvedeny v příloze 1. Roztoky a kultivační media jsou uvedeny v příloze 2.

4.1.4. Primery

Před transformací rostlin mikrotubulárními markery, byly klonovány genové konstrukty *mCherry-TUA6* a *mCherry-TUB6*. Pro amplifikaci a kontrolu genů pro tubulin α a β byly použity klonovací primery, amplifikující cds (kódující sekvenci):

TUA6BamHI Fw 5'-AGGATCCAATGAGAGAGTGCATTTTCGATC-3'
TUA6SalI Rv 5'-AGTCGACTTAGTATTCCTCTCCTTCATC-3'
TUB6BamHI Fw 5'-AGGATCCAATGAGAGAAATCCTTCACATTC-3'
TUB6SalI Rv 5'-AGTCGACTCACTCATGATCCAATATCTCT-3'

Před transformací rostlin a suspenzních kultur markerem pro *PLD δ* , byla kontrolována přítomnost sekvence pro konstrukt *GFP-PLD δ* pomocí primerů:

eGFP-PLD δ vpK7WGF2 Fw 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAG-3'
eGFP-PLD δ vpK7WGF2 Rv 5'-TGGTTAAAGTGTTCAGGAAGAGC-3'

Genotypizace inserčních mutantních linií *pld δ* SALK_023247 se realizovala s pomocí primerů:

LBb1.3 5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'
plddaLP023247 5'-ATCCTACAGTGCAAATCGTGC-3'
plddaRP023247 5'-AGGAAAGGAAGTCAGGTGAGG-3'

Nepřítomnost fragmentu *PLD δ* v mRNA (cDNA) v inserční mutantní linii *pld δ* SALK_023247 se kontrolovala za použití primerů:

qplddBefInsFw 5'-CCGTAAGGTTATCACCAGCG-3'
qplddBefInsRv 5'-CGAACCGGGATCTTAGCC-3'

K orientační kontrole reportérových genů (fluorescenční markery) se používaly primery:

mCherryEr Fw 5'-GCGAGGAGGATAACATGG-3'
mCherryEr Rv 5'-TACTTGTACAGCTCGTCC-3'
RFPzGW Fw 5'-CGTCATCAAGGAGTTCATGC-3'
RFPzGW Rv 5'-GTACTGTTCCACGATGGTG-3'
GFPzpGreen Fw 5'-TAAACGGCCACAAGTTCAG-3'
GFPzpGreen Rv 5'-TGTACAGCTCGTCCATGC-3'
eGFPzP2FGW7 Fw 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAG-3'
eGFPzP2FGW7 Rv 5'-TGTACAGCTCGTCCATGC-3'

4.1.5. Bakteriální kmeny

Agrobacterium tumefaciens

C58C1 s pGV2260

Agricultural biotechnology center, Maďarsko
(Bechtold *et al.*, 1993)

E. coli DH5 α

Clontech, USA

E. coli XL1blue

PřF, UK (Mattanovich *et al.*, 1989)

4.1.6. Rostlinný materiál

Rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia-0, divoký typ (dále označováno *Ath* WT)

Rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-0, GFP-PLD δ (fosfolipasa D δ ; dále označováno GFP-PLD δ).

Transformováno plasmidem pK7WGF2 pomocí *Agrobacterium tumefaciens* do divokého typu; promotor 35S z viru kvěťákové mozaiky; selekce kanamycinem
připraveno v Laboratoři biochemie rostlin, VŠCHT v Praze, J. Matoušková, P. Šimandl (Šimandl 2011)

Rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-0, WT, GFP-TUA6 (tubulin α 6; dále označováno GFP-TUA6)

Transformováno plasmidem pCambia1300 pomocí *A. tumefaciens* do divokého typu; promotor 35S z viru kvěťákové mozaiky, selekce hygromycinem,
dar od Dr. J. Ambrose, Pennsylvania, USA (Ambrose *et al.*, 2007)

Rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-5, mutantní linie v genu GLABROUS 1, GFP-TUA6 (tubulin α 6; dále označováno GFP-TUA6g11)

Transformováno plasmidem pBI 121 (Clontech) pomocí *A. tumefaciens* (kmen pGV2260) do *gl-1* mutantní linie; promotor 35S z viru kvěťákové mozaiky, selekce kanamycinem,
dar od Prof. Hashimoto, NARA Institut, Japonsko (Ueda *et al.*, 1999)

Rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-0, WT, GFP-TUB6 (tubulin β 6; dále označováno GFP-TUB6)

Transformováno plasmidem pCambia1300 pomocí *A. tumefaciens* do divokého typu; promotor 35S z viru kvěťákové mozaiky, selekce hygromycinem
dar od Dr. J. Ambrose, Pennsylvania, USA (Ambrose *et al.*, 2007)

Rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-0, WT, GFP-fABD2 (fimbrin Actin Binding Domain; dále označováno GFP-fABD2)

Transformováno plasmidem pCB302 pomocí *A. tumefaciens* do divokého typu; promotor 35S z viru kvěťákové mozaiky, selekce detekcí GFP
dar od Dr. K. Schwarzerové, PřF UK, Praha (Voigt *et al.*, 2005)

Rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-0, WT, mCh-TUA5 (tubulin α 5; dále označováno mCh-TUA5). Transformováno upraveným plasmidem pEG104 pomocí *A. tumefaciens* do divokého typu; promotor 35S z viru květákové mozaiky, selekce fosfotricinem a detekcí mCherry

dar od Dr. S. Perssona, Potsdam, Německo (Gutierrez *et al.*, 2009, Sampathkumar *et al.*, 2011)

Rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-0, WT, mCh-TUA6 (tubulin α 6; dále označováno mCh-TUA6). Transformováno plasmidem pGreen 0029 pomocí *A. tumefaciens* do divokého typu; promotor 35S z viru květákové mozaiky, selekce kanamycinem a detekcí mCherry, připravováno v laboratoři K. Schwarzerové (E. Bellinvia, J. Matoušková), PřF UK, Praha

Rostliny *A. thaliana* s vyřazenou funkcí genu *PLD δ* pomocí inserce T-DNA, linie SALK 023247 (dále označováno *pld δ A*) a linie SALK 092469 (dále označováno *pld δ B*)

T-DNA v obou případech vložena plasmidem pROK2 (Alonso *et al.*, 2003)

rostliny získány z Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla, Kalifornie, USA

Rostliny *A. thaliana* s vyřazenou funkcí genu *EDS1* pomocí inserce T-DNA, linie SALK 057149 (dále označováno *eds1*) T-DNA vložena plasmidem pROK2 (Alonso *et al.*, 2003)

rostliny získány z Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla, Kalifornie, USA

4.2. Metody

4.2.1. Kultivace a mikroskopie rostlinného materiálu

4.2.1.1. Kultivace rostlinného materiálu

K odhalení dynamiky aktinového cytoskeletu po působení cytoskeletárních drog a signálních molekul byly použity sedmi- až desetidenní rostliny *Arabidopsis thaliana*, Col-0, WT stabilně transformované konstruktem *GFP-fABD2* (Voigt *et al.*, 2005). Při povrchové sterilizaci byla semena nejprve ošetřena 90% ethanolem, pro lepší smáčivost, poté sterilizována 20% Savem a třikrát promyta sterilní vodou a vysazena pipetou na sterilní tuhé medium. Rostliny byly sterilně pěstovány na tuhém, modifikovaném MS mediu - ARA mediu (Illes *et al.*, 2006) v režimu krátkého dne – 8 hodin světlo s intenzitou 110-150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, při teplotě 22°C – den, 20°C – noc. Relativní vlhkost byla 50%. Uzavřená miska se semeny byla do růstové komory umístěna vertikálně, aby semenáčky rostly po povrchu agaru a mohly být později bez poškození přemístěny na podložní sklo k provádění experimentu.

Pro sledování kolokalizace PLD δ s MT a biolistické ošetřování, stejně jako pro selekce rostlin byly používány pěti- až třicetidenní rostliny *A. thaliana*, Col-0, WT stabilně transformované konstruktem *GFP-PLD δ* , *GFP-TUA6* nebo *mCh-TUA5* (Gutierrez *et al.*, 2009), popřípadě dvojité linie *A. thaliana*, Col-0 se stabilně vnesenými konstrukty *GFP-fABD* a *mCh-TUA5* (Sampathkumar *et al.*, 2011). Rostliny byly pěstovány nesterilně na zahradním substrátu

v režimu krátkého dne – 8 hodin světlo s intenzitou $110-150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, při teplotě 22°C ve dne, 20°C v noci. Relativní vlhkost byla 50%.

Pro sledování zapojení PLD δ a MT v solném stresu byly používány pětidenní rostlinky *Arabidopsis thaliana*, Col-0 divokého typu (WT) a linie inserčních mutantů *A. thaliana*, Col-0, *pld δ* SALK_023247. Při povrchové sterilizaci byla semena nejprve ošetřena 90% ethanolem, pro lepší smáčivost, poté sterilizována 20% Savem a třikrát promyta sterilní vodou a vysazena pipetou na sterilní tuhé medium. Byly pěstovány na standardním MS mediu (Murashige *et al.*, 1962) s přidavkem 1% sacharosy, zpevněném 1,2% agarem, v režimu krátkého dne – 8 hodin světlo s intenzitou $110-150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, při teplotě 22°C ve dne, 20°C v noci. Relativní vlhkost byla 50%. Sterilní misky s rostlinami byly umístěny vertikálně do růstové komory, aby kořínky neprorůstaly do agaru a bylo možné je během experimentu bez poškození přemístit na agarové plotny s obsahem soli.

Metabolomická studie byla prováděna na jedenáctidenních semenáčcích *A. thaliana*, Col-0 WT a sterilně pěstovaných v tekutém MS mediu (Murashige *et al.*, 1962) v titračních destičkách, medium se obměňovalo jednou za sedm dní. Rostlinky byly kultivovány v režimu dlouhého dne – 10 hodin světlo s intenzitou $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, při teplotě 22°C . Relativní vlhkost byla 70%.

4.2.1.2. Kultivace suspenzních kultur

Tabákové buněčné linie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 (Nagata *et al.*, 1992) byly pěstovány v 250 ml Erlenmeyerových baňkách v 50 ml tekutého BY-2 media za stálého míchání 150 RPM v orbitálním inkubátoru (Sanyo Gallenkamp Orbi-Safe), při teplotě 27°C ve tmě. Kultura byla udržována tak, že každých sedm dní bylo 10 ml suspenzní kultury převedeno za sterilních podmínek do 50 ml čerstvého tekutého BY-2media.

Buněčné linie *Arabidopsis thaliana*, Col-0, divokého typu (Axelos *et al.*, 1992) byly pěstovány ve formě buněčné suspenzní kultury v 250 ml Erlenmeyerových baňkách v 50 ml tekutého Hellerova media při teplotě 22°C a konstantním míchání 130 RPM v orbitálním inkubátoru (Sanyo Gallenkamp Orbi-Safe) se stálým maximálním osvětlením (zářivkami Osram L 30W Lumilux Cool White). Každých sedm dní bylo 10 ml suspenzní kultury převedeno za sterilních podmínek do 50 ml čerstvého tekutého Hellerova media.

4.2.1.3. Ošetření rostlin

Cytochalasin E – **CytE** (Sigma Aldrich) byl nejprve rozpuštěn v DMSO (zásobní roztok 4 mM, uchovávat v -80°C) a zásobní roztok přidán k růstovému mediu tak, aby vznikla požadovaná koncentrace (10 nebo 20 μM). 2mM (uchovávat v -80°C) zásobní roztok latrunkulinu B – **LatB** (Sigma-Aldrich) v DMSO byl přidán do růstového media tak, aby vznikla 100-500 nM koncentrace používaná k ošetření rostlin během mikroskopického

experimentu. Roztoky byly po celou dobu experimentu uchovávány v ledu. Nejvyšší koncentrace DMSO v pracovním roztoku dosáhla 0,25%.

Oryzalin byl rozpuštěn ve vodě (zásobní roztok 20 mM, uchovávat při 4°C) a do media přidán tak, aby vznikla 20 μM konečná koncentrace.

1 M zásobní vodný roztok salicylátu sodného - **SA** (Sigma Aldrich) byl přidán k růstovému mediu tak, aby vznikla požadovaná koncentrace pracovního roztoku (250 μM, 1mM a 50 μM).

1 M zásobní roztok 4-hydroxybenzoové kyseliny – **HBA** (Sigma Aldrich) byl přidán k růstovému mediu tak, aby vznikla požadovaná koncentrace pracovního roztoku (250 μM a 1mM).

Odpovídající množství kyseliny fosfatidové – **PA** (Sigma Aldrich) bylo rozpuštěno v 200 μl chloroformu a následně odpařeno na vakuové odparce, poté bylo přidáno živné medium tak, aby vznikl 10 mM zásobní roztok (připravovat vždy *ex tempore*). Odparek byl v mediu dispergován sonikací. Úspěšnost procesu byla hodnocena dle opalescence roztoku. Těsně před upotřebením byl zásobní roztok naředěn živným mediem na 10 μM koncentraci.

Odpovídající množství **n-butanolu** nebo **tert-butanolu** (Sigma Aldrich) bylo rozpuštěno v růstovém mediu, tak, aby vznikl 0,1% roztok.

Při aplikaci solného stresu byla po pěti dnech růstu část rostlin přesunuta na MS zpevněné medium se 150 mM nebo 200 mM **NaCl** (Lachner ČR). Po 30 minutách, 2, 3 a 5 hodinách působení probíhala fixace rostlin a imunoznačení mikrotubulů v kořenech.

Fluorescenční barvivo **FM4-64** se nejprve rozpustilo v DMSO (zásobní roztok 20 mM, uchovávat v -80°C), poté se roztok přidal do růstového media, tak, aby vznikla požadovaná koncentrace 20 μM.

Všechny konečné koncentrace roztoků se připravovaly *ex tempore* a byly udržovány na ledu.

4.2.1.4. Imunohistochemické značení mikrotubulů

Fixace a imunoznačení pětidenních ošetřených i kontrolních rostlin *A. thaliana*, Col-0, WT a *pldδ* probíhala ve speciálních Petriho miskách (100x100 mm) rozdělených mřížkou na 25 jamek (P – LAB, ČR) do kterých byly umístěny košíčky s rostlinami, takže nebylo nutné s rostlinkami přímo manipulovat při výměně roztoků. Košíčky byly zhotoveny z asi 1,5 cm části 15 ml plastové zkumavky, na jednu stranu tohoto prstence byla připevněna nylonová membrána (Nylon net filters, 41 μm, Millipore), takže vzniklo jakési sítko.

Fixace probíhala v roztoku 1,5% paraformaldehydu a 0,5% glutaraldehydu v pufru PMET za sníženého tlaku 400-500 mBar po dobu 40 minut. Důležité bylo, aby snižování i zvyšování tlaku probíhalo velmi pozvolna (asi 2 minuty). Po promytí v PMET roztoku, probíhala 15 minut (přesně) digesce buněčných stěn pomocí 0,01% pektolyasy a 0,1% pektinasy v PBS pufru. Po promytí roztokem PME s přídavkem 10% glycerolu se rostlinky odvodnily 10 minut v podchlazeném methanolu při teplotě -20°C. Následovala rehydratace v PBS a blokování pomocí 1% BSA s 0,1% Tritonem X-100 v PBS po dobu 30 minut. Poté se aplikovala primární protilátka (myší monoklonální protilátka IgM proti α-tubulinu, Sigma Aldrich) v ředění 1:1 000 přes noc. Po promytí PBS byla aplikována sekundární králičí IgG protilátka konjugovaná s FITC v ředění 1:30 po dobu 1 hodiny při 37°C. Následovalo promytí PBS a

přenesení rostlin do 50% glycerolu v PBS. Rostlinky takto uložené v chladu je možno pozorovat až dva týdny.

4.2.1.5. Konfokální mikroskopie rostlin a suspenzních kultur

Subcelulární struktury živých i trvalých preparátů byly pozorovány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 5 DUO. K vizualizaci GFP a fluorescenční barvy FITC byla použita excitace argonovým laserem o vlnové délce 744 nebo 488 nm, pro RFP a mCh 532 nm a emitované světlo procházelo děličem paprsků HFT 488 a emisním filtrem v rozmezí 505-550 nm. Používán byl objektiv Zeiss C-Apochromat 40x/ 1,2 UV-VIS-NIR nebo Plan-Apochromat 63x/ 1,40 Oil DIC.

Při mikroskopii rostlin po ošetření signálními molekulami byly rostlinky z tuhého media opatrně přeneseny na podložní sklo s kapkou media a překryty krycím sklem, tak, že se nepřekrývalo se sklem podložním, ale bylo pootočeno o 45°, aby jeho hrany vyčnívaly z podložního skla. Protože byl při experimentu používán konfokální mikroskop s invertovanými objektivy, byla tato úprava nutná k tomu, aby bylo během experimentu možné vyměňovat u vzorku roztoky bez toho, aby se vzorek pohnul. Bylo totiž nutné snímat stejnou část před a po ošetření danou chemikálií, aby bylo možné porovnat působení látek na stejné oblasti cytoskeletu. Sledována byla vrstva kortikálního cytoskeletu pod plasmatickou membránou epidermálních buněk abxiální strany třetího a čtvrtého pravého listu, děložních listů, hypokotylů a meristemická a elongační zóna kořene. Na pravých listech bylo u špičky místo, kde byly buňky na ploše asi 90 x 90 μm velmi ploché a rovné, toto místo bylo ideální pro snímání cytoskeletu. Cytoskelet byl sledován před ošetřením a 1-45 min po ošetření v intervalech přibližně 10 min. Série začínala tam, kde se objevily první mikrotubuly a následně bylo proskenováno ještě 10-15 snímků směrem do středu buňky, vzdálenost mezi jednotlivými snímky byla 400 nm.

Při sledování změn protilátkou značených mikrotubulů po působení solného stresu byla pozorována elongační zóna kořene trvalého preparátu *A. thaliana* Col-0 divokého typu – WT a inzerčního mutantu *pldδ* SALK_023247 ve vzdálenosti 300-420 μm a 540-660 μm od apexu kořene, kde je typické transverzální uspořádání mikrotubulů. V jednotlivých místech kořene byly pořizovány série snímků, těsně pod plasmatickou membránou buněk. Série začínala tam, kde se objevily první mikrotubuly a následně bylo proskenováno ještě 10-15 snímků směrem do středu buňky, vzdálenost mezi jednotlivými snímky byla 400 nm. Cílem bylo získat v jednom kořeni alespoň šest buněk, ve kterých by bylo možné spočítat množství mikrotubulů na 20 μm délky kořenové buňky.

Kolokalizační studie, sledování subcelulární lokalizace exprese PLDδ a selekce transformovaných rostlin bylo realizováno screeningem epidermálních buněk děložních a pravých listů, hypokotylů a kořenů *A.thaliana*. Části rostlin byly upraveny tak, aby byly dostatečně ploché (např. vyříznutím středových žilek velkých listů) přeneseny na podložní sklo s kapkou media. Serie snímků začínala v oblasti plasmatické membrány a následně bylo proskenováno ještě 10-15 snímků směrem do středu buňky, vzdálenost mezi jednotlivými snímky byla 100-400 nm.

Při kolokalizačních experimentech na suspenzních kulturách BY-2, *A. thaliana* a sledování buněk při odvozování buněčné kultury *A.thaliana* stabilně transformované genovým konstruktem *GFP-TUA6* bylo 200 µl buněčné suspenze aplikováno na podložní sklo mezi dva tenké proužky parafilmu. Krycí sklo bylo umístěno na proužky parafilmu, tak aby nebyly buňky suspenze příliš stlačeny. Buňky suspenze byly nejprve skenovány za použití menšího zvětšení 10-20 x, po nalezení buněk exprimujících hledané konstrukty byly detaily snímány při zvětšení 40-63x. Série snímků začínala v oblasti plasmatické membrány a následně bylo proskenováno ještě 10-15 snímků směrem do středu buňky, vzdálenost mezi jednotlivými snímky byla 100-400 nm.

4.2.1.6. Fluorescenční mikroskopie rostlin a suspenzních kultur

Změny buněk kořenů patnáctidenních semenáčků *A.thaliana* WT a *pldδ* po ošetření solí a cytoplasmatické proudění v buňkách hypokotylů sedmidenních *A. thaliana* GFP-fABD po ošetření signálními molekulami bylo sledováno optickým fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E600 mikroskop (Nikon, Japonsko) s přidanou funkcí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) podle Nomarského. Použito bylo zvětšení neinvertovaného objektivu Nikon Plan Fluor 20x/0,50 a Nikon Plan Fluor 40x/0,75. Obrázky byly snímány barevnou digitální kamerou (DVC 1310C, USA).

4.2.1.7. Spinning disk mikroskopie rostlin

Subcelulární lokalizace exprese PLDδ a selekce transformovaných rostlin *A. thaliana* byla sledována v epidermálních buňkách děložních a pravých listů sedmi až třicetidenních rostlin pěstovaných nesterilně. Části rostlin byly upraveny tak, aby byly dostatečně ploché (např. vyříznutím středových žilek velkých listů) přeneseny na podložní sklo s kapkou media. Serie snímků začínala v oblasti plasmatické membrány a následně bylo proskenováno ještě 10-15 snímků směrem do středu buňky, vzdálenost mezi jednotlivými snímky byla 100-400 nm.

Ke snímání sekvencí fotografií byl použit SDCM (Spinning disk confocal microscope) Olympus IX81-Andor SDCM (USA, UK), objektivem Olympus PlanApoN 60x /1,42 nebo Olympus U ApoN340 40x/1,15. Zdrojem světla byl laser o vlnové délce 488 nebo 516 nm, emitované světlo procházelo filtry o vlnové délce 525 nebo 617 nm. Ke snímání se používala CCD kamera Clara, Andor

4.2.1.7. Analýza obrazu

Pro analýzu délky aktinových filament v epidermálních buňkách listů *A. thaliana* GFP-fABD2 po ošetření signálními molekulami byly vybrány obrázky před ošetřením a každých 5-10 min po ošetření, což bude označováno jako jeden experiment. Při snímání obrázků v každém čase před a po ošetření byla pořízena vždy série o 10-15 snímcích, které se lišily místem snímání v z-ose preparátu. Série začínala těsně pod plasmatickou membránou buňky a postupovalo se po 400 nm směrem do nitra buňky. Obrázky v rámci jednoho experimentu, které se lišily časem po ošetření, byly vybírány tak, aby fotka zachycovala vždy stejné místo nejen v souřadnicích x,y, ale i v ose z. Takže bylo nutno ze série například 60-90 obrázků

vybrat pouze 6 v programu Zeiss LSM Image Browser. Obrázky byly pořizovány s laterálním rozlišením 114 nm/pixel a nebo před analýzou upraveny na toto rozlišení. Pokud se nepodařilo nasnímat preparát v celé šíři snímku v dobré kvalitě (kvůli nerovnosti preparátu), byly vybírány pouze oblasti s dostatečnou ostrostí pomocí programů Adobe Photoshop Software (Mountain, View, CA, USA) nebo Image J (freware from National Institutes of Health, USA). Pokud došlo během pokusu k pohybu preparátu, byly vždy vybírány odpovídající oblasti a snímky v rámci jednoho experimentu srovnány do série nad sebe. Obrázky byly potom automaticky zpracovány pomocí specifického skriptu vytvořeného na základě programů Image J, Perl a Gnuplot. V první fázi byly obrázky filtrovány užitím FFT (Fast Fourier transformation) a Low Pass filtrů s definovanou orientací, čímž byly zobrazeny vždy struktury se souhlasným převládajícím nasměrováním. Tento krok byl opakován 18x, vždy s pootočením filtru o 10°. V každém kroku byla rozpoznána jednotlivá vlákna s pomocí automatického prahování. Spojením dílčích obrázků pootočených o 10° byl pořízen binární obraz, složený z rozpoznávaných vláken o různé orientaci a tloušťce, připravený k samotné analýze. Po vizuální kontrole zpracování jednotlivých obrazů, byla automaticky vyhodnocena délka filament (posléze přepočtená na délku v μm) a byly vytvořeny histogramy četnosti filament (částic) o jednotlivých délkách pro každý spojený obraz (Matouskova *et al.*, 2014).

4.2.2. Příprava konstruktů mCherry-TUA6 a mCherry-TUB6

Pro studium kolokalizace mikrotubulů s PLD δ bylo potřeba připravit transgenní rostliny exprimující marker pro mikrotubuly. Pomocí restrikčních enzymů BamHI a Sall byl vystřižen gen pro tubulin $\alpha 6$ nebo $\beta 6$ (*Arabidopsis thaliana*) z vektorem pER8 (dar od prof. Hashimoto z NARA Institutu, Japonsko). Po amplifikaci pomocí specifických primerů byly geny mechanicky vypreparovány a pročištěny z gelu. Poté se zaligovaly do klonovacího vektoru pDRIVE (UA hybridizace, Qiagen). Po sekvenční kontrole fragmentu, transformací *E.coli* DH5- α daným plasmidem a amplifikací v *E. coli* byly geny opět vystřiženy pomocí BamHI a Sall restrikčních enzymů a zaklonovány do modifikovaného vektoru pGreen 0029, který obsahoval S35 promotor z viru mozaiky kvěťáku, nopalín syntasový terminátor a reportérový gen mCherry (Hellens *et al.*, 2000), po transformaci byl plasmid opět amplifikován v *E.coli*. Vnesení nepoškozeného konstruktů bylo kontrolováno pomocí PCR, restrikčních enzymů a sekvenace.

4.2.2.1. Transformace bakteriálních kmenů

Pomocí tepelného šoku byl plasmid pGreen 0029 (kanamycinová rezistence jak pod bakteriálním, tak i pod rostlinným promotorem) s konstruktem *mCherry-TUA6*, *mCherry-TUB6* vnesen do kompetentních buněk *E. coli* x-blue nebo DH-5 α . Poté byly buňky selektovány pomocí modro-bílé selekce a zároveň pěstovány pod selekčním tlakem kanamycinu 50 $\mu\text{g/ml}$. Bylo vybráno několik (asi 15) bílých kolonií a „rozčárkovány“ na novou plotnu s kanamycinem a x-gal činidlem pro modrobílou selekci. Pět nejlépe narostlých kolonií bylo použito na kontrolní PCR pro ověření přítomnosti vložených konstruktů. Poté byly vybrány dvě kolonie a inokulovány do tekutého media,

po 14-16 hodinové kultivaci při 37°C a za stálého promíchávání 130 RPM byl plasmid izolován pomocí setu Midi-prep (Qiagen, Nizozemí) a jeho intaktnost zkontrolována sekvenací.

Poté už bylo možné plasmidem pGreen (Hellens *et al.*, 2000) s konstruktem *mCherry-TUA6*, *mCherry-TUB6* nebo plasmidem pK7WGF2 (dar od doc. J. Marce, University of Sydney) s konstruktem *GFP-PLD δ* (spektinomycinová rezistence pod bakteriálním a kanamycinová rezistence pod rostlinným promotorem) elektroporačně transformovat *Agrobacterium tumefaciens*, kmen pGV 2260 (Bechtold *et al.*, 1993) a stabilně jím později transformovat rostliny a nebo suspenzní kultury.

Při transformaci *A. tumefaciens* pomocí pGreen0029 bylo nutné použít ještě pomocný plasmid pSOUP (tetracyklinová rezistence) a p19 (gentamycinová rezistence), který napomáhá zabránit umlčování vnášených genů v rostlinách.

Transformované bakterie rostly do OD₆₀₀= 1,2 ve 30 ml YEB tekutého media za tmy a stálého třepání 130 RPM. Kromě antibiotik pro jednotlivé plasmidy (kanamycin 50 µg/ml, tetracyklin 2 µg/ml, gentamycin 50 µg/ml, spektinomycin 100 µg/ml) bylo nutné přidat ještě rifampicin 50 µg/ml proto, aby *Agrobacterium* v roztoku nepřerůstaly jiné bakteriální kmeny.

Pro pozdější potřebu byly jak z *E. coli* x-blue, tak i z jednotlivých natransformovaných kultur *A. tumefaciens* připraveny konzervy, které lze až 1 rok uchovávat v -80°C: 500 µl bakteriální kultury s densitou OD₆₀₀ = 1,8 smícháme s 500 µl sterilního 50% glycerolu a zchladíme v tekutém dusíku, poté uložíme dobře popsané do -80°C.

Vpřípadě potřeby další plasmidové DNA s vneseným konstruktem se nejprve pomocí tepelného šoku transformují bakterie *Escherichia coli* DH5a, nechají se pomnožit přes noc a plasmidová DNA se vyizoluje pomocí kitu „Miniprep“ nebo „Midiprep“ podle požadovaného množství DNA.

4.2.2.2. Transformace *E. coli* metodou tepelného šoku

Hluboce zamražené (-80°C) kompetentní buňky *E. coli* DH-5a se nechají 30 min rozmraznout na ledu. Smíchá se 1 µl vektorové DNA s 50 µl kompetentních buněk a suspenze se nechá 25 min inkubovat na ledu. Pak se bakterie vystaví tepelnému šoku při 42°C po dobu 60 s a ihned se přenesou zpět na led. Po dvou minutách na ledu se bakteriální suspenze přenesou do 1 ml na ledu vychlazeného SOC media a nechá se 1 h třepat při 37°C. Pak se buňky centrifugují 2 min

při 3500g. Přebytný supernatant se odstraní, peleta buněk se rozmíchá v 100 µl supernatantu a přenesou se na pevné LB medium s příslušnými antibiotiky a kultivuje při 37°C, druhý den se hodnotí úspěšnost transformace.

4.2.2.3. Transformace elektrokompetentních buněk *A. tumefaciens* elektroporací

Kompetentní buňky se rozmrazí na ledu a elektroporační kyvety se vychladí. Nastavení elektroporátoru je následující: 25 µF, 2 kV, 200 Ω. 4 µl na ledu uložené vektorové DNA se napipetují k 50 µl bakteriální suspenze, která se nechá přesně 1 min na ledu. Roztok buněk a cca 1µl plasmidové DNA (100 ng/µl) přenesený do elektroporační kyvety se vystaví

elektrickému výboji. Ihned po výboji se buněčná suspenze smíchá s 1 ml YEB media a nechá se 3 h kultivovat při 28°C a 200 RPM. Poté se buněčná suspenze centrifuguje 2 min při 3500g. Supernatant se odpipetuje tak, aby zbylo 100 µl supernatantu a peleta se v tomto množství rozmíchá a nanese na YEB agarové medium s požadovanými antibiotiky. Bakterie se inkubují v misce uzavřené parafilmem při 28°C 3 dny.

4.2.3. Transformace rostlin a buněčných suspenzních kultur

4.2.3.1. Biolistická transformace pro transientní expresi genových konstruktů

Biolistická metoda transformace rostlin spočívá v dopravení zlatých nebo wolframových částic (průměr kolem 1µm) pokrytých studovaným genovým konstruktem v příslušném plasmidu nejlépe do epidermální vrstvy rostlinného pletiva nebo do buněk suspenzní kultury. K aplikaci zlatých částic bylo použito BPDS (Biolistic Particle Delivery System), který doslova nastřeluje zlaté částice do rostlinného pletiva pomocí stlačeného plynu. Biolistická transformace se prováděla dvěma přístroji *Helios Gene Gun System* (BioRad) na Katedře experimentální biologie rostlin, PřF UK v Praze, a nebo na přístroji *PDS-1000/He System* (BioRad) na VŠCHT, Praha. Přístroje se liší tím, že v prvním případě není třeba rostlinný materiál umisťovat do vakuové komory, druhý má vakuovou komůrku přímo zabudovanou.

Aplikace vektorové DNA na povrch zlatých částic

Zásobní roztok zlatých částic (60 mg v 1 ml 50% sterilního glycerolu) uložený při 4°C se nechá 10 min při pokojové teplotě a nejméně 1 min intenzivně vortexuje, ihned se odebere 6 µl suspenze do sterilní mikrozkušavky a na ledu se přidá 1µl plasmidové DNA (optimální koncentrace je 1 µg/ µl), 6 µl 2,5 M roztoku chloridu vápenatého a 2,5 µl 100 mM vodného roztoku spermidinu. Směs se 3 min vortexuje a poté centrifuguje 30 s při 10 000 g, supernatant se odsaje. Peleta se 1 min vortexováním dobře promíchá v 50 µl 70% ethanolu a 30 s centrifuguje při 10 000 g, supernatant se odstraní. Poslední krok se zopakuje se 100% bezvodým ethanolem. Nakonec se peleta resuspenduje vortexem v 10 µl 100% bezvodého ethanolu a suspenze se rovnoměrně nanese na membránu, ze které budou částice přímo aplikovány do rostlinného pletiva, a ethanol se nechá úplně odpařit (Modifikováno dle (Ueki *et al.*, 2009).

Aplikace zlatých částic s vektorovou DNA do rostlinného materiálu

Dobře vysušená membrána pokrytá zlatými částicemi se vloží do biolistického přístroje, zlaté partikule musí být na spodní straně membrány. Nad membránu se umístí další membrána tzv. průlomový disk, který praskne při definovaném tlaku helia. Na malou Petriho misku se zpevněným živným médiem se rozvrství rostlinný materiál - listy abaxiální stranou směrem vzhůru nebo odvodněná buněčná kultura ve vrstvě silně nejvýš 1,5 mm se přikryje filtrační membránou Nylon net filters, 41 µm (Millipore), která se zafixuje, aby byl rostlinný materiál chráněn před poměrně silným proudem helia a nepřemístil se. Petriho miska s materiálem se vloží do držáku přístroje 6 cm pod upevněnou membránu se zlatými částicemi. Přístroj se uzavře a uvnitř se vytvoří vakuum 6,517 kPa (-28 inch/Hg). Poté se ihned začne zvyšovat tlak helia nad průlomovým diskem, který praskne, jakmile hodnota tlaku helia dosáhne 7 583,4 kPa (1 100 psi - pounds per square inch) a proud helia narazí na membránu se zlatými částicemi, nárazem se zlaté částice odlepi od membrány a definovanou rychlostí se zanoří

do buněk rostlinného materiálu. Rostlinný materiál se vyjme, odstraní se filtrační membrána, miska se uzavře a na povrch se označí přesně místo aplikace zlatých částic (to je přibližně kruh o průměru asi 1,5 cm). Buňky se inkubují v podmínkách pro ně typických 16-20 h podle typu použitého vektoru a konstruktů. Listy se inkubují v pro ně běžných podmínkách 20-24 h podle typu použitého vektoru a genového konstruktů. Úspěšnost experimentu se ověřuje mikroskopicky po uplynutí doby nezbytné k transkripci a translaci genových konstruktů.

4.2.3.2. Transformace rostlin *A. thaliana* pro stabilní expresi genových konstruktů

Pro transformaci rostlin byl využit modifikovaný standardní protokol využívající ponoření květenství huseníčku do bakteriální suspenze (floral-dip) (Clough *et al.*, 1998).

Pro zvýšení klíčivosti byla semena *A. thaliana* 3 dny stratifikována při teplotě 4°C, poté vyseta na zahradnický substrát a umístěna do růstové komory v režimu krátkého dne (odstavec 4.2.1.1.). Jakmile se plně vyvinuly růžice listů rostlinek, byl režim změněn na dlouhý den (12 hodin den i noc), čímž se docílilo rychlého a synchronizovaného vykvetení rostlin. Pro úspěšnost transformace je důležité, aby byly květy rostlin v podobném stadiu rozvoje. Pro transformaci je nejvhodnější pupen květu, u kterého se právě objevily okvětní lístky. Čím časnější stadium květu je transformováno, tím je větší šance transformovat první buňky nové rostliny a získat rostlinu s homogenní populací transformovaných buněk. Je proto doporučováno odstranit květy, které jsou vyvinutější a tím eliminovat pozdější zbytečnou práci se selekcí nehomogenních rostlin.

Květy ve správném stadiu vývoje se namáčí asi na pět sekund do roztoku floral-dip media s optimální hustotou populace transformovaného *A. tumefaciens* (OD = 0,8) a přídavkem 20 µM acetosyringonu, který působí jako atraktant a navíc spouští expresi některých genů u *A. tumefaciens* (Sheikholeslam *et al.*, 1987). Poté se květenství přikryjí mikrotenovým sáčkem, aby bakteriální suspenze nevyschla a nechá se působit 24 h, rostliny se umístí do růstové komory do tzv. Arasystému (Valvekens *et al.*, 1988), který zajistí možnost separování semen z každé rostliny zvlášť. Velice si usnadníme pozdější selekci, jestliže během doby zrání semen odstraňujeme dorůstající, netransformované květy. Po dozrání semen získáme T₀ populaci. Tato semena je vhodné nechat 24 hodin v -20°C, protože se tím sníží možnost pozdější kontaminace bakterií *A. tumefaciens* při selekci.

Semena T₁ generace jsou hemizygotní a u semen T₂ generace je už možno pozorovat štěpné poměry a selektovat vhodné rostliny nejprve selekčním tlakem použitého antibiotika a později u vybraných rostlin kontrolovat přítomnost exprese genového konstruktů pomocí mikroskopie.

4.2.3.3. Ověření homozygotní linie u inserčních mutantů *A. thaliana pldδ* SALK 023247

Izolace genomové DNA

Z třítydenních rostlin mutantní linie *A. thaliana pldδ* SALK 023247 byl odebrán list nebo část listu o průměru přibližně 0,5 cm, přenesen do Eppendorfovy zkumavky a byl rozetřen o její

dno sterilní homogenizační tyčinkou. K rozdrocenému listu bylo přidáno 400 µl Extrakčního pufru, suspenze se krátce vortexovala a poté byla odstředěna 1 min při 14 000 g. 300 µl supernatantu bylo přeneseno do čisté zkumavky a smíseno s 300 µl isopropanolu. Směs byla krátce vortexována a ponechána 2 min, aby se vysrážela DNA, poté byla sraženina odstředěna 5 min při 14 000 g. Po opatrném odsátí supernatantu byla peleta sušena přibližně 5-10 min při 37°C a následně rozpuštěna ve 100 µl T₁₀E₁.

Genotypizace mutantních linií *Arabidopsis thaliana pldδ* Při genotypizaci se využívá sada tří primerů ve dvou PCR reakcích. V jedné reakci (LP, RP primery) se sleduje přítomnost asi 1 200 bp velkého fragmentu pro část PLD δ a tento fragment se amplifikuje v heterozygotních liniích a rostlinách divokého typu. Ve druhé PCR reakci (RP, LBb1.3 primery) se amplifikuje část nefunkční PLD δ a část inzertu T-DNA z *A. tumefaciens* o velikosti 600-900 bp a tento fragment je přítomen v homozygotních i heterozygotních rostlinách. U všech osmi *pldδ* mutantních linií se objevila amplifikace PCR produktu pouze u sady primerů RP a LBb1.3, což znamená, že šlo o homozygoty a rostliny bylo možné využít k pokusům. 10 µl vzorků po PCR bylo smíseno v poměru 6:1 s vzorkovým barvivem (LD) a rozděleno horizontální gelovou elektroforezou na 1% agarose v TAE při napětí 100V. Gel byl následně obarven interkalačním barvivem GelRed a vizualizován pomocí UV záření.

Složení roztoku na PCR:		Nastavení cycleru na PCR:	
H ₂ O	12 µl	Předehřátí víčka na 106°C	
Taq polymerasový pufr	2 µl	1. krok	94°C 3 min
MgCl ₂	1,5 µl	2. krok	94°C 45s
dNTP	1 µl	3. krok	58°C 30s
Fw primer (10µM)	1 µl	4. krok	72°C 30s
Rev primer (10µM)	1 µl	zpět na 2. krok, 30x	
Taq polymerasa	0,5 µl	5. krok	72°C 10 min
Vzorek DNA	1 µl	6. krok	konec, 4°C

4.2.4. Odvození buněčných suspenzních kultur z *Arabidopsis thaliana*

Odvozování suspenzní kultury probíhalo po celou dobu za přísně sterilních podmínek. K odvození buněčné suspenze byly použity listy sedmi- až desetidenních semenáčků *A. thaliana* stabilně transformovaných genovým konstruktem *GFP-TUA6* vypěstovaných ze semen. Při povrchové sterilizaci byla semena nejprve ošetřena 90% ethanolem, pro lepší smáčivost, poté sterilizována 20% roztokem SAVO, třikrát promyta sterilní vodou a vysazena pipetou na sterilní tuhé medium. Rostliny byly pěstovány na tuhém ARA mediu (Illes *et al.*, 2006) v režimu krátkého dne – 8 hodin světlo s intenzitou 110 – 150 µmol.m⁻².s⁻¹, při teplotě 22°C – den, 20°C – noc. Relativní vlhkost byla 50%.

Poté se sterilně, skalpelem, oddělilo nejméně čtyřicet lístků a řeznou stranou umístilo na tuhé Gamborgovo medium pro indukci kalusů, která trvala 3-4 týdny. Kalusy se vždy po sedmi dnech přenášely sterilně na čerstvé, tuhé Gamborgovo medium do té doby, než narostlo dostatečné množství kalusové hmoty – asi 2 cm³. 50 ml tuhého Gamborgova media bylo

v širokohrdlé titrační baňce nalito šikmo. Kalusová hmota byla skleněnou lopatičkou rozdělena na kalusové klastry o velikosti asi 1 mm³ a přenesena do 50 ml tekutého Hella media s přidavkem pectolyasy (0,1% roztok), polygalakturonasy (0,1% roztok) a nebo směsi pectolyasy a polygalakturonasy (0,05+0,05% roztok), přeneseny do třepačky a jednou za sedm dnů pasážovány do čerstvého media.

4.2.5. Extrakce rostlin pro metabolickou studii

Jedenáctidenní rostliny *Arabidopsis thaliana*, Col-0 WT a mutantní linie *eds1* bez ošetření nebo WT rostliny 6h po ošetření 50 μM SA, 0,1% n-butanolem (1-butanol) nebo jeho inaktivním analogem 0,1% tert-butanolem a kombinací SA s n-butanolem nebo SA s tert-butanolem byly umístěny spolu s keramickými kuličkami (velikost 1 mm) umístěny v mikrozkuvkách do homogenizačního přístroje Fast Prep a homogenizovány rychlostí 6,5 m.s⁻¹ po dobu 30 s. Poté se stejným způsobem opakovala homogenizace a přidavkem 0,7 ml methanolu. Homogenát se přenesl do nové mikrozkuvky, kuličky byly znovu propláchnuty 0,7 ml methanolu a spojené frakce byly centrifugovány 3 min při 16 000 g. Supernatant byl přenesen do skleněné zkuvky určené pro analýzu hmotnostní spektrometrií a uložen při -80°C.

4.2.6. Hmotnostní spektrometrie

Pro metabolickou analýzu extraktů *A. thaliana* byla využita technika vysokotlaké kapalinové chromatografie UHPLC [(Acquity Ultra High Performance LC System (Waters, USA)] ve spojení s hmotnostním detektorem QTOFMS [Synapt G2 HD quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Waters, USA)]. Pro separaci se užívala analytická kolona HSS T3, 1,7 μm; 100 x 2,1 mm. Použitá mobilní fáze: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a 0,1% kyselina mravenčí v methanolu v poměrech uvedených v tabulce 3. Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 3: Podmínky separace extraktů *A.thaliana* pomocí UHPLC. Mobilní fáze A odpovídá 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v methanolu, doplněno roztokem 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě.

Čas (min)	Průtok (ml.min ⁻¹)	% A
0	0,40	90
6	0,45	0,1
10	0,60	0,1
10.1	0,40	90
12	0,40	90

Tabulka 4: Podmínky analýzy extraktů *A. thaliana* pomocí techniky UHPLC- QTOFMS.

UPLC-QTOFMS	
Podmínky analýzy	
Ionizační mód	Negativní – ESI ⁻
Teplota na zdroji	120 °C
Desolvatační teplota	350 °C
Hmotnostní rozsah	50,00-1000,00 <i>m/z</i>
Rozlišení	40 000 FWHM
Nástřík	5 µl
Průtok plynu (dusík)	800 l·hod ⁻¹ (desolvatace) 10 l·hod ⁻¹ (pomocný plyn)
Kontrolní hmota (Lock Mass)	roztok leucin-enkephalin koncentrace: 2 ng·ml ⁻¹ hmota: <i>m/z</i> =554,2615 průtok: 20 µl·min ⁻¹
Fragmentace	Žádná/MS ^E

5. Výsledky a diskuse

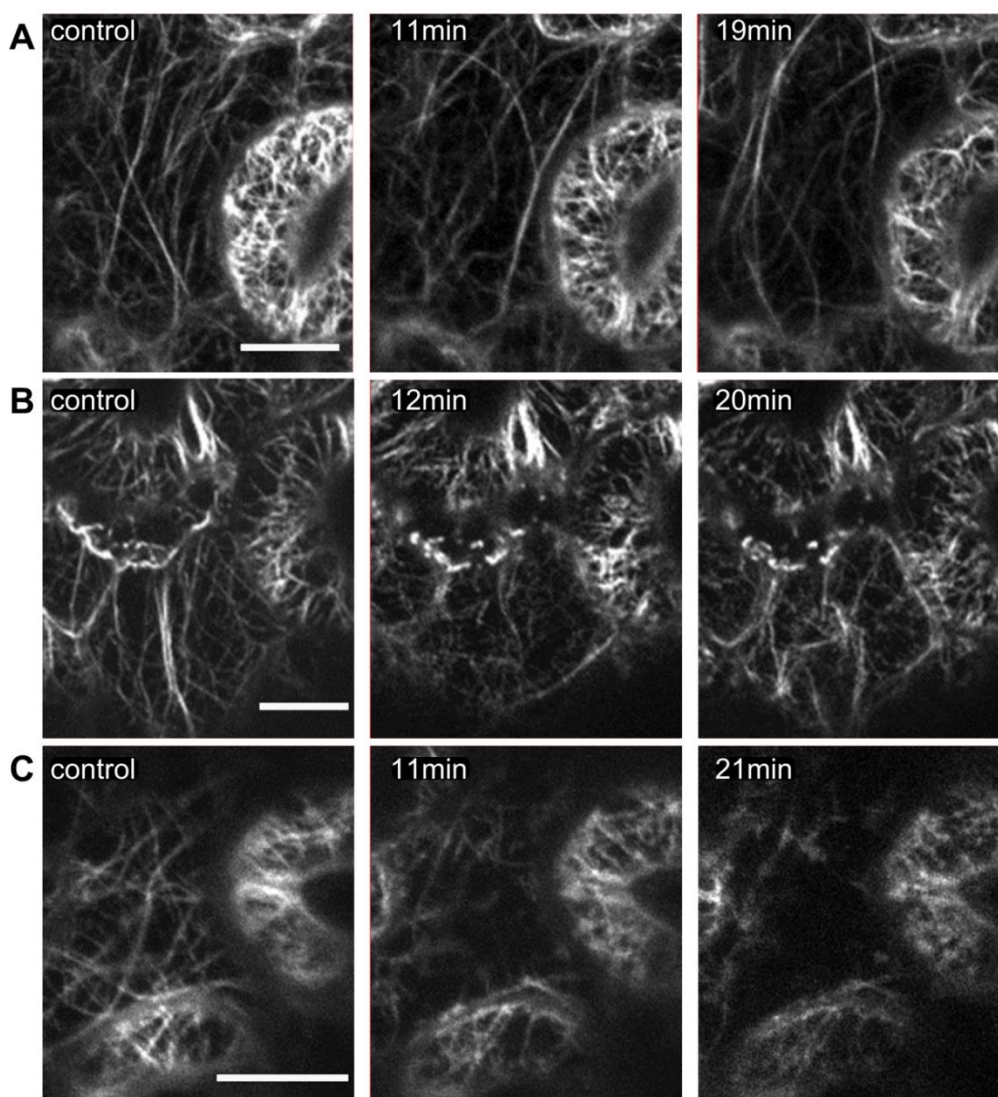
5.1. Změny cytoskeletu v časných stadiích obranné reakce

Cytoskeletální drogy cytochalasin E (CytE) i latrunkulin B (LatB) destabilizují aktinový cytoskelet, ačkoliv obě látky působí poněkud jiným mechanismem účinku (odstavce 2.3.3.). Kobayashi na listech tabáku dokázal, že depolymerace aktinového cytoskeletu způsobená CytE přímo souvisí s hypersenzitivní reakcí a zvýšením transkripce *PR-1* a *PR-2* genů, což jsou markery signalizace kyseliny salicylové během obranné reakce. Zároveň se ukázalo, že i LatB zvyšuje expresi markerů SA signální dráhy – *PR1* a *PR2* a *WRKY38* během hypersenzitivní odpovědi, ale neovlivňuje markery dráhy jasmonátové – *LOX2* (lipoxygenase 2), *VSP2* (vegetative storage protein 2) a *AOS* (allen oxide synthase) (Obr. 7 A, B) (Kobayashi *et al.*, 2007, Matouskova *et al.*, 2014). Zvýšení exprese markerů dráhy, kde je zapojena kyselina salicylová (SA) bylo pozorováno i po infekci biotrofními patogeny, stejně jako po ošetření rostlin SA. Dalším vodítkem pro zkoumání úlohy aktinového cytoskeletu v průběhu signální dráhy SA bylo i to, že exprese genů *PR1*, *PR2* a *WRKY38* nebyly výrazně ovlivněny při aplikaci oryzalinu - látky destruuující mikrotubulární cytoskelet, proto byly experimenty prováděny na cytoskeletu aktinovém. (Obr. 7C) (Matouskova *et al.*, 2014).

Na počátku experimentů jsme ověřovali působení cytoskeletálních drog na aktinový cytoskelet v rostlinách *A. thaliana* GFP-fABD2, abychom si vytvořili představu o přesné dynamice těchto dějů.

Naše pozorování aktinového cytoskeletu v listech, ale i ostatních orgánech *Arabidopsis thaliana* se shodují víceméně s tím, co bylo popsáno u buněk zelených řas *Chara sp.* v rostlinách tabáku nebo *A. thaliana* (Foissner *et al.*, 2007, Henty-Ridilla *et al.*, 2013, Kobayashi *et al.*, 2007, Staiger *et al.*, 2009). 10 μ M koncentrace cytochalasinu E způsobuje během deseti minut zánik jemných vláken kortikálního cytoskeletu, po dvaceti minutách je možné vidět už jen fragmenty silných provazců laterálně spojených vláken, která zůstávají poměrně stabilní po celou dobu pozorování.

Po ošetření 200 nM latrunkulinem B byl už po pěti minutách pozorován rozpad tenkých vláken cytoskeletu na struktury podobné jednotlivým bodům a krátkým vláknům, zbylá vlákna se zdají přerušovaná nebo na některých místech ztenčená, jinde se objevují svítící body buď na konci vlákna, nebo i v jeho průběhu, po 10 min už chybělo mnoho vláken. I silné provazce aktinu vykazují změny, jejich struktura není pravidelná, ale některé oblasti se jeví vykrojené. Na rozdíl od vzorků ošetřených cytochalasinem E, kdy pozorujeme pouze fragmenty silných vláken, je kortikální vrstva vzorků po ošetření latrunkulinem B pokryta mnoha svítícími body, obraz vypadá často zamlžený. (Obr. 12 B,C). Podobný úbytek AF po působení cytoskeletálních drog byl pozorován u většiny zkoumaného rostlinného materiálu.



Obr. 12: Porovnání změn dynamiky aktinových filament u *Arabidopsis thaliana* po ošetření SA a cytoskeletálními drogami.

Epidermální buňky listů 7-10 denních rostlin *A. thaliana* GFP-fABD2 byly ošetřeny (A) 1mM salicylátem sodným, (B) 200 nM latrunkulinem B a (C) 10 μ M cytochalasinem E. Přibližně 4 μ m kortikální vrstvy pod plasmatickou membránou (po 400 nm krocích) epidermálních buněk u abaxiální strany listu bylo pozorováno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss) před a do 20 min po ošetření. Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu ve stejném místě a jsou typickým výsledkem pozorovaným během třiceti opakování po ošetření SA a pěti opakování po ošetření LatB a CytE. Měřítka odpovídá 10 μ m (Matouskova *et al.*, 2014).

5.1.1. Kyselina salicylová i benzothiadiazol způsobuje rozpad aktinových filament

Listy *A. thaliana* exprimující fúzní protein GFP-fABD2, pro vizualizaci aktinových filament ošetřené 1 mM salicylátem (SA), vykazují během 40 min úbytek vláken při pozorování konfokálním skenovacím mikroskopem.

Celý experiment byl proveden v osmdesáti paralelních pozorováních a úbytek vláken byl pozorován v šedesáti sedmi případech. Třicet vzorků bylo následně použito k obrazové analýze a kvantifikaci počtu a délky vláken. V textu bude popisováno chování cytoskeletu jako rozpad nebo depolymerace, což nemusí odpovídat přesnému mechanismu úbytku vláken (který nebyl po ošetření SA dosud popsán), avšak aktinový cytoskelet se chová podobně jako po ošetření cytoskeletálními drogami. Bylo sledováno několik typů snižování počtu vláken, které se poněkud lišily časem i způsobem rozpadu, ale vždy byly doprovázeny vznikem silnějších svazků aktinových filament (AF) kolem 20-30 min po ošetření. V 75% případů byl rozpad filament detekovatelný už po 10 min a dále se prohluboval v průběhu dalších 20 min. Ve zbylých 25% případů bylo po 10 min patrné snížení počtu vláken, jejich počet však do 20 min opět vzrostl téměř na původní hodnotu a následně postupně klesal. Způsob rozpadu se také lišil: u 60% vzorků se jemná i středně silná vlákna rozpadala na krátká filamenta (která se často zdála být laterálně vykrajovaná) nebo bodové útvary, což připomínalo rozpad po ošetření LatB; u 40% vzorků nastalo prosté mizení vláken, které připomínalo dynamiku po ošetření CytE. Oblast obklopující zbylá vlákna byla často plná jemných teček nebo signálu připomínajícího mlhu. (Obr.12 A, 13 A)

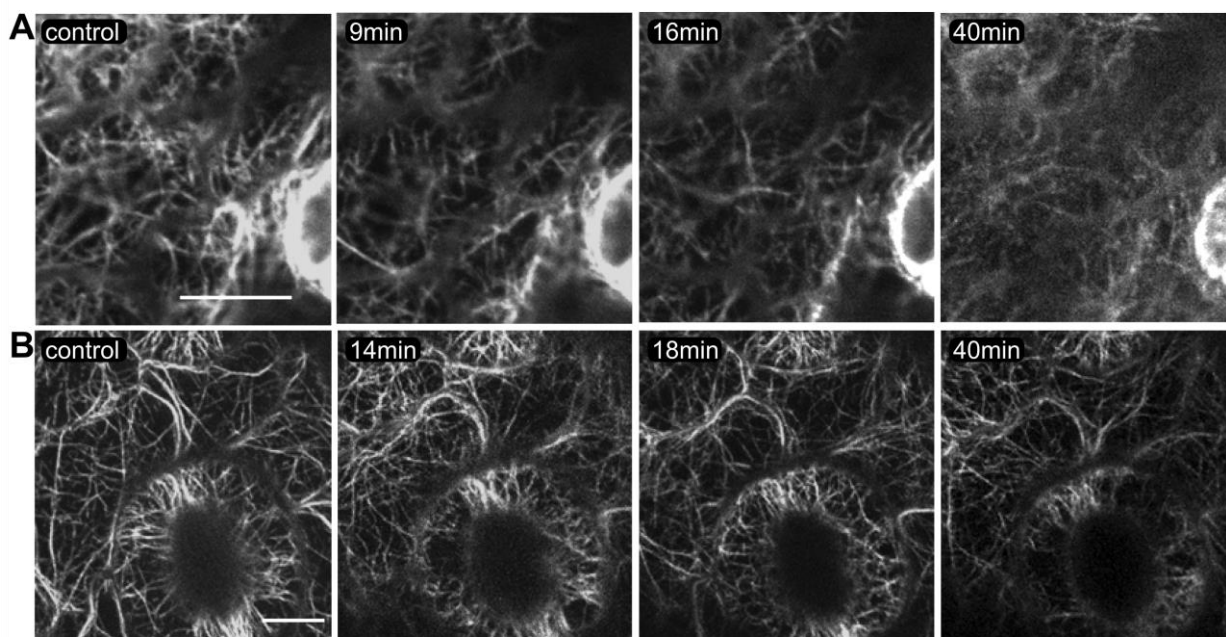
Obvykle kolem 40 min po ošetření nastal výraznější rozpad filament na krátká vlákna a jednotlivé body. Ačkoliv tedy celkový počet částic (krátkých, rozpadlých vláken a bodů) vzrostl, počet delších zachovaných vláken s délkou nad 5,7 μm výrazně poklesl. (Tab. 5)

Tab. 5: Tabulka rozložení délek aktinových filament v různých časech po ošetření 1 mM SA \pm SD (n = 3-7) (Matouskova *et al.*, 2014).

Čas po přidání SA [min]	0	1-20	21-40	41-60
Počet AF 0-5.7 μm [%]	56.5 \pm 0.9	47.3 \pm 5.7	42.1 \pm 3.8	120.3 \pm 16.1
Počet AF >5.7 μm [%]	43.5 \pm 0.9	39.7 \pm 1.2	34.8 \pm 3.3	28.5 \pm 2.56
Součet [%]	100 \pm 0	87 \pm 6.4	76.9 \pm 6.7	148.8 \pm 18

V počátečních fázích experimentů se testovala i 250 μM koncentrace SA, která působila na rostlinný cytoskelet později – kolem dvacáté minuty a jediným pozorovaným efektem byl nepřilíš výrazný úbytek jemných vláken a vznik silných aktinových provazců, fragmentace ani vznik bodových částic pozorovány nebyly, proto byla pro experimenty zvolena koncentrace čtyřnásobná.

Benzothiazol (BTH), který je funkčním analogem SA, způsobuje podobně jako SA výraznou indukci exprese markerových genů SA signální dráhy. Jeho účinek je silnější než účinek SA. K ošetření listů huseníčku byl použit v 300 μM koncentraci a byla sledována dynamika AF. Aktinový cytoskelet reagoval na BTH podobně jako SA, a to jak způsobem rozpadu, tak i časovým průběhem (Obr.13)



Obr. 13: Změny dynamiky aktinových filament u *Arabidopsis thaliana* po ošetření SA a BTH.

Epidermální buňky listů 7-10 denních rostlin *A. thaliana* GFP-fABD2 po ošetření (A) 1mM salicylátem sodným (SA), (B) 300 μ M benzothiodiazolem (BTH). Přibližně 4 μ m kortikální vrstvy pod plasmatickou membránou (po 400 nm krocích) epidermálních buněk u abaxiální strany listu bylo pozorováno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss) před a do 40 min po ošetření. Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu ve stejném místě a jsou typickým výsledkem pozorovaným během třiceti opakování po ošetření SA a pěti opakování po ošetření BTH. Měřítka odpovídá 10 μ m (Matouskova *et al.*, 2014).

Pozorované změny v dynamice aktinového cytoskeletu po působení SA byly zpracovány a kvantifikovány metodami analýzy obrazu, jak je uvedeno v kapitole 4.2.1.7. Analýza potvrdila snížení počtu aktinových filament během 30 min po ošetření 1 mM SA s vysokou spolehlivostí (hodnoty koeficientu spolehlivosti se blížily 1) (Obr. 14)

Pro ověření toho, že dynamika aktinového cytoskeletu není ovlivňována působícím laserovým světlem mikroskopu (Krzyszowiec *et al.*, 2007), bylo provedeno kontrolní snímání stejného místa na listu rostliny po ošetření rostlin růstovým médiem. Při použité frekvenci snímání (každých 5-10 min) a intenzitě laseru kolem 10-20% nastala fototoxická reakce asi po 60-70 minutách v neošetřených buňkách listu *A. thaliana* GFP-fABD2. Rostlinný cytoskelet během 40 minut po ošetření vykazoval po působení světla o vlnové délce 488 nm pouze běžnou dynamiku se statisticky nevýznamným úbytkem jemných vláken. V žádném případě nebylo pozorováno fragmentování vláken nebo vznik silných svazků.

Obr. 14: Kvantitativní vyhodnocení analýzy obrazu.

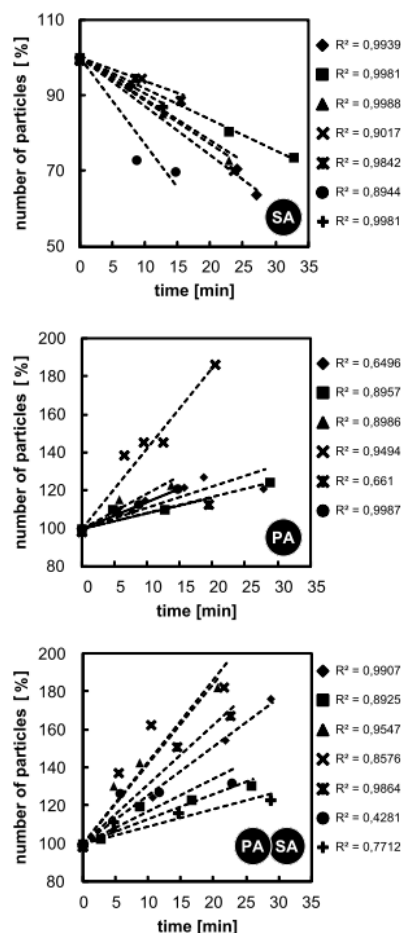
Epidermální buňky listů 7-10 denních rostlin *A. thaliana* GFP-fABD2 po ošetření (SA) 1mM salicylátem sodným, (PA) 10 μ M sodnou solí 1,2-dioktanoyl-sn-glycerol 3 fosfátu a (PA, SA) 10 μ M PA 11-18 min před přidáním 1mM SA. U všech vyhodnocených experimentů (6 – 8 na každé ošetření) byl počet aktinových filament před ošetřením vyjádřen jako 100%. Různé symboly v grafech představují jednotlivé pokusy. Pro každý experiment byl spočítán koeficient hodnoty spolehlivosti R^2 (Matouškova *et al.*, 2014).

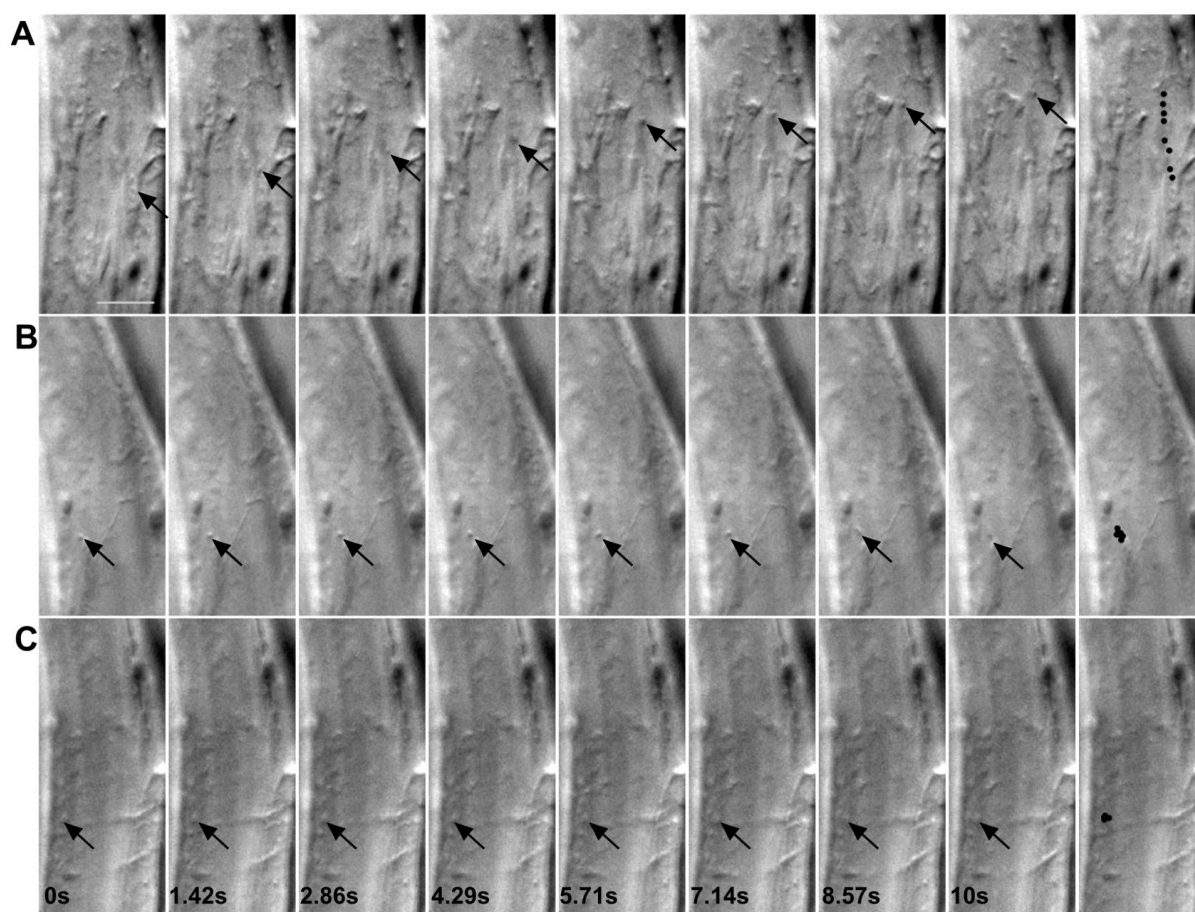
Podobně byla použita kyselina 4-hydroxybenzoová jako kontrola k potvrzení signální funkce jejího analogu kyseliny salicylové. Cílem bylo vyloučit, že by změny aktinových vláken po působení kyseliny salicylové byly ovlivněny změnou pH. I v tomto případě byly pozorovány změny způsobené běžnou fototoxicitou laseru mikroskopu.

Poslední kontrolou bylo ošetření rostlin 0,25% roztokem DMSO, který byl užit při přípravě zásobních roztoků cytoskeletálních drog. Tato koncentrace DMSO nepůsobí během mikroskopického snímání toxicky ani neovlivňuje dynamiku cytoskeletu.

Jako marker funkčnosti cytoskeletu se často sleduje cytoplasmatické proudění v buňce, při poškození funkce cytoskeletu se často proudění zpomalí nebo zastaví. Protože se cytoplasmatické proudění lépe pozoruje v dlouhých, anizotropních buňkách, byly tři paralelní experimenty prováděny na epidermálních buňkách hypokotylů *Ath* GFP-fABD2. Během jednoho experimentu byly pořizovány sekvence sedmdesáti snímků vybraných buněk po dobu 10 s, kamerou optického fluorescenčního mikroskopu za použití diferenciálního interferenčního kontrastu podle Nomarského. Obrázky byly hodnoceny ručně v programu ImageJ metodou sledování jednotlivé částice (particle tracking). Pohyb částic v cytoplasmě byl hodnocen před přidáním 1mM SA a 10 i 40 min po něm.

Podářilo se prokázat, že 1 mM SA výrazně zpomaluje pohyb cytoplasmy v buňkách hypokotylů už po 10 min, po 40 min pohyb cytoplasmy téměř ustal. Pohyb byl patrný pouze v oblasti velkých cytoplasmatických provazců (Obr. 15).





Obr. 15: Kyselina salicylová ovlivňuje cytoplasmatické proudění v buňkách.

Hypokotylы 7-10 denních rostlin *A. thaliana* GFP-fABD2 snímané v sekvencích optickým mikroskopem (Nikon) s funkcí diferenciálního interferenčního kontrastu (A) před ošetřením, (B) 10 min po ošetření 1mM salicylátem sodným (SA), (C) 40 min po ošetření 1mM SA. Poslední obrázek každé řady znázorňuje pohyb jedné sledované částice během celé časové sekvence. Měřítko odpovídá 10 μm (Matouskova *et al.*, 2014).

Ošetření salicylovou kyselinou mělo během pokusů napodobit vzrůst hladiny SA při signalizačních procesech, které nastávají po rozpoznání přítomnosti biotrofního patogenu i během některých typů abiotického stresu rostlinnými buňkami. Exogenně přidaná SA je schopna se (zatím neidentifikovanými přenašeči) během 5 min inkorporovat do rostlinných buněk (P. Skůpa, P. Dobrev, nepublikovaná data). Základní zjištěná hladina SA v buňkách *A. thaliana* je 250-1000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé váhy (Rivas-San Vicente *et al.*, 2011), zatímco během SA signalizace vzrůstá téměř desetkrát (Summematter *et al.*, 1995). Pro napodobení SA signalizace jsme nejprve použili exogenně aplikovanou 250 μM koncentraci SA, což je asi 40x vyšší koncentrace než ta, která byla zjištěna u buněk neprojevujících obrannou odpověď. Odpověď aktinového cytoskeletu však byla pomalá a nedostatečná, a proto jsme koncentraci zvýšili na 1mM. Vycházeli jsme z předpokladu, že odpověď rostlinných buněk na patogen neprobíhá difúzně v celém objemu buňky, ale často je kompartmentalizovaná jen do určité části buňky (Hardham *et al.*, 2008), a proto může být relativně daleko vyšší. 1mM

koncentrace SA způsobila během 40 min významný úbytek nebo rozpad AF. Byly pozorovány dva rozdílné způsoby ubývání vláken. Ve větším procentu případů fragmentace filament připomínala mechanismus podobný tomu po ošetření LatB, který způsobuje zpomalení připojování nových G-aktinových jednotek k tvořícímu se vlákně (Morton *et al.*, 2000). Rozdílný způsob rozpadu aktinových vláken po působení CytE nebo LatB byl popsán i u živočišných buněk (Wakatsuki *et al.*, 2001). Dynamika cytoskeletu, která zahrnuje rozpad a polymeraci jednotlivých vláken i svazků je běžná, zdá se být v neošetřených buňkách náhodná (Staiger *et al.*, 2009). Po ošetření SA jsme však pozorovali úbytek vláken, který vykazoval dlouhodobější trend a vedl po 6 h k mírnější a po 24 h k výrazné expresi markeru SA signalizace - *PR1* (Obr.14 SA, 7 A). Podobný rozpad aktinových filament byl pozorován po 30min působení toxinu z *Verticillium dahliae* v suspenzních kulturách *A. thaliana* (Yuan *et al.*, 2006). U rostlin *A.thaliana* indukoval toxin z *Verticillium dahliae* expresi genu pro obranný protein – *PR1*, 12 -24 h po aplikaci (Jiang *et al.*, 2005). Podobně byla pozorována exprese *PR1* – markerů SA signalizace 48 h po aplikaci bakteriálního kmene *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CD 3000 na buňky suspenzní kultury *A. thaliana*. Avšak u rostlin *A. thaliana* nebyl po inokulaci bakteriálním kmenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CD 3000 pozorován v prvních 18 h rozpad aktinového cytoskeletu, naopak, autoři uvádějí výraznou polymeraci aktinových vláken, která vedla k úspěšné obraně rostliny proti bakteriím (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Jak si tedy vysvětlit naše pozorování rozpadu aktinového cytoskeletu po působení SA, které prokazatelně vede ke spuštění obranné reakce u rostlin huseníčku? Odpověď najdeme ve správném načasování polymerace a rozpadu AF. Henty-Ridilla uvádí sice polymeraci AF prvních 18h po infekci, poté však nastává úbytek vláken s maximem mezi 24 a 27 h po ošetření (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Víme, že typická obranná odpověď probíhá takto: percepce biotrofní bakterie *P. syringae* > SA signalizace > exprese obranných PR1 proteinů. V rostlinách *A. thaliana* byl počátek exprese genu pro PR1 protein pozorován 24 h po inokulaci bakteriemi *P. syringae* a 6 h po aplikaci SA. Z toho vyplývá, že SA signalizace začíná kolem 18 h po střetu s bakteriemi a to se kryje s úbytkem denzity AF (i v porovnání s kontrolou) popsaném Henty-Ridillou a naším pozorováním rozpadu aktinových filament bezprostředně po přidání SA (Henty-Ridilla *et al.*, 2013, Matouskova *et al.*, 2014). Z těchto pozorování vyplývá jednoznačná informace: inokulace rostlin *A.thaliana* bakteriálním kmenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CD 3000 vede v prvních 18 h k polymeraci AF, potom nastává změna, aktinová filamenta se začínají rozpadat a počátek tohoto rozpadu odpovídá hromadění SA v buňkách, které nastává s počátkem SA signalizace, tj. asi 18 h po percepci patogenu. Dynamika aktinového cytoskeletu tedy hraje během obranné odpovědi *A. thaliana* proti biotrofům významnou roli a přesně načasované střídání polymerace nebo rozpadu AF rozhoduje o tom, zda povede buněčná signalizace k úspěšné nebo neúspěšné obraně proti bakteriálním patogenům.

Zbývá ještě pokusit se zhodnotit význam změn AF z pohledu rostlinné fyziologie: proč nastane v buňce po určitém signálu náhlý rozpad aktinové sítě?

Rostlinné buňky se musí po setkání s patogenem přeprogramovat z normálního „vývojového“ režimu na „záchranný“ režim (Walters *et al.*, 2007). energii při obraně tedy nevynakládají např. na procesy, kde je zapojen auxin, ale přepnou například na signalizaci pomocí SA. Bylo totiž potvrzeno, že SA inhibuje auxinovou signalizaci a tím například také zastavuje růst

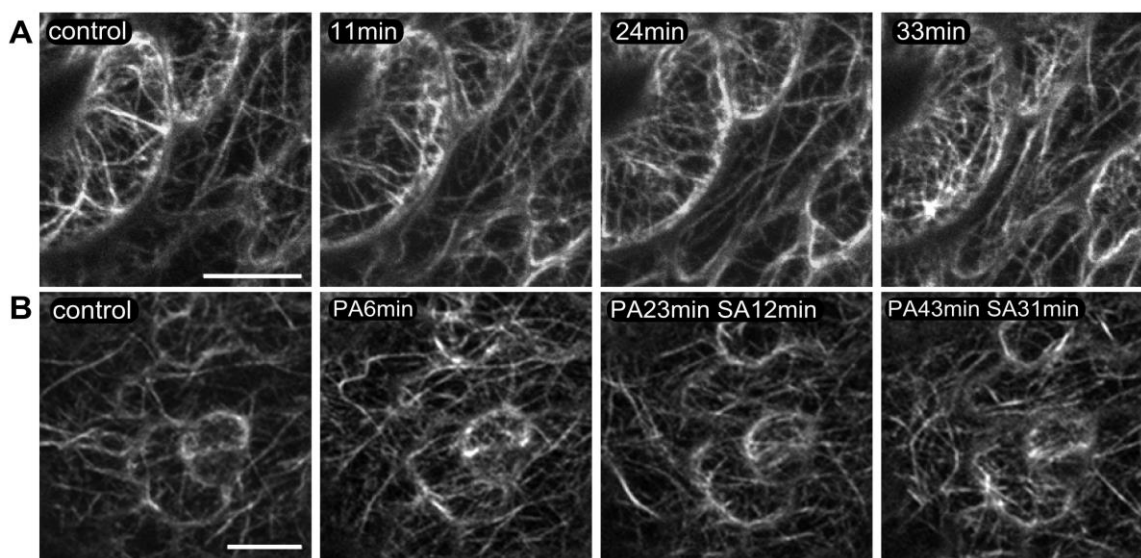
bakterií v intracelulárních prostorech (Wang *et al.*, 2007). Důsledkem takového přeprogramování může u aktinového cytoskeletu znamenat přesměrování dopravy nejrůznějších „nákladů“: proteinů, jejich komplexů i organel na velké vzdálenosti v rámci buňky. A nebo také může buňka rozpadem cytoskeletu eliminovat z dopravy „náklady“, které jsou nutné pro růst a vývoj a se vznikem nové aktinové sítě začít dopravovat „náklady“ nutné na obranu. Rozpad AF může být také jenom dalším signálem, pakliže se předpokládá, že neporušená dynamika cytoskeletu je součástí teorie strážců diskutované v kapitole 2.1.2. Je možné, že rychlý rozpad aktinové sítě a vznik nové je pro buňky méně energeticky náročný a jistě rychlejší, než kdyby tento proces nastával krok za krokem (vzpomeňme na Augiáše). To, že po rozpadu AF nastává fáze polymerace, je dost pravděpodobné, protože jinak by buňka nemohla přežít. Možným vysvětlením tohoto jevu by mohlo být, že F-aktin vytvořený *in vitro* stimuloval aktivitu PLD β 1 a tím i tvorbu PA v pylových láčkách tabáku, kdežto monomerní G-aktin aktivitu této fosfolipázy inhibuje (Pleskot *et al.*, 2010). *In vitro* tvořící se F-aktin měl většinou vlákna dlouhá 0,5-10 μ m (Sept *et al.*, 1999), což odpovídá velikosti vláken, která vznikala po rozpadu dlouhých AF v pozdějších fázích po ošetření SA (Tab. 5). Jestliže vlákna těchto velikostí aktivovala PLD β 1, mohla posléze vznikající PA stimulovat aktinový cytoskelet k polymeraci (blokováním čepičkujícího proteinu - CP) a návratu buněčného prostředí k „normálnímu“ režimu po proběhlé signalizační události, uskutečněné v tomto případě dočasným rozpadem aktinového cytoskeletu.

5.1.2. Kyselina fosfatidová aplikovaná před kyselinou salicylovou zabrání rozpadu aktinového cytoskeletu

U živočišných buněk se popisují změny dynamiky aktinového cytoskeletu po působení kyseliny fosfatidové (PA) už v roce 1993. Podobný trend byl pozorován i u rostlin a naše pozorování se od publikovaných, až na detaily, neliší (Ha *et al.*, 1993). Kyselina fosfatidová se váže na čepičkující protein (CP), který blokuje rychle rostoucí konce aktinových vláken. Vazbou PA se čepičkující protein uvolní, což vede ke zvýšení počtu vláken (Huang *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2012).

Po působení 10 μ M dioktanoyl fosfatidové kyseliny bylo již kolem 20. min možné pozorovat nárůst počtu jemných aktinových filament v kortikální vrstvě abaxiální strany epidermálních buněk prvních pravých listů *A. thaliana* s vneseným *GFP-fABD2* konstruktem (Obr.16 A). U neošetřených částí rostliny bývá běžným jevem přítomnost jemných aktinových vláken, ale i silnějších svazků, avšak po ošetření PA svazky mizí a bývá viditelná pouze struktura jemných vláken. Takové uspořádání je jen přechodné, protože už kolem 25.-30. minuty nastává silné svazkování jemných vláken a opticky se jejich počet jeví relativně nižší.

Pokračováním tohoto experimentu bylo přidání kyseliny salicylové (SA) po 11-18 minutách působení PA. Pozorovali jsme, že předchozí přidání PA, zabraňuje rozpadu a fragmentaci aktinového cytoskeletu, které normálně nastává po působení SA (Obr.16 B). Navíc, analýza obrazu odhalila, že po působení obou molekul aktinová vlákna příliš nesvazkují, jak to bylo pozorováno po aplikaci samotné PA. V grafu můžeme vidět relativně vyšší nárůst počtu vláken po ošetření PA a následně SA než je tomu po ošetření PA samotnou (Obr 14 PA a PASA).



Obr. 16: Změny dynamiky aktinu u *Arabidopsis thaliana* po ošetření PA a PA následovaným SA. Epidermální buňky listů 7-10 denních rostlin *A. thaliana* GFP-fABD2 po ošetření (A) 10 μM sodnou solí 1,2-dioktanoyl-sn-glycerol 3 fosfátu (PA), (B) 10 μM PA přidaným 11-18 min před přidáním 1mM salicylátu sodného (SA). Přibližně 4 μm kortikální vrstvy pod plasmatickou membránou (po 400 nm krocích) epidermálních buněk u abaxiální strany listu bylo pozorováno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss) před a do 40 min po ošetření. Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu ve stejném místě a jsou typickým výsledkem pozorovaným během patnácti opakování u obou typů pokusů. Měřítka odpovídá 10 μm (Matouskova *et al.*, 2014).

Možný mechanismus účinku PA byl již na počátku kapitoly vysvětlen vazbou PA na čepičkující protein, který uvolní rychle rostoucí konce aktinových filament a ta začnou polymerovat a lze pozorovat nárůst počtu vláken. Je také možné, že ABP ovlivněných PA je více a mechanismů vedoucích k polymeraci cytoskeletu také a mohou působit navzájem synergicky (Henty-Ridilla *et al.*, 2014).

PA přidaná před SA ochrání aktinový cytoskelet před rozpadem, ale zároveň zabrání svazování aktinových vláken, které nastává po samotné PA. K relevantnímu vysvětlení tohoto mechanismu není bohužel v současné době dostatek dat.

5.2. *In vivo* interakce fosfolipasy D δ a mikrotubulárního cytoskeletu

Význam fosfolipidové signalizace i mikrotubulárního cytoskeletu je mnohokrát popisován při vývojových procesech, ale i biotickém a abiotickém stresu. Přímý důkaz propojení MT s PLD δ a potažmo i s plasmatickou membránou by mohl být slibným počátkem pochopení signální funkce tohoto enzymu v interakci s mikrotubulárním cytoskeletem. Tato interakce by mohla hrát důležitou roli například v exocytose nebo endocytose (Meijer *et al.*, 2003). O interakci kortikálních mikrotubulů (MT) s plasmatickou membránou se spekuluje již velmi dlouho. Poprvé v roce 1978 byly na mikrofotografiích pořízených elektronovým mikroskopem zachyceny „můstky“ spojující jednotlivé mikrotubuly s plasmatickou membránou u vodních kapradin rodu *Azolla* (Hardham *et al.*, 1978). V průběhu času se přišlo

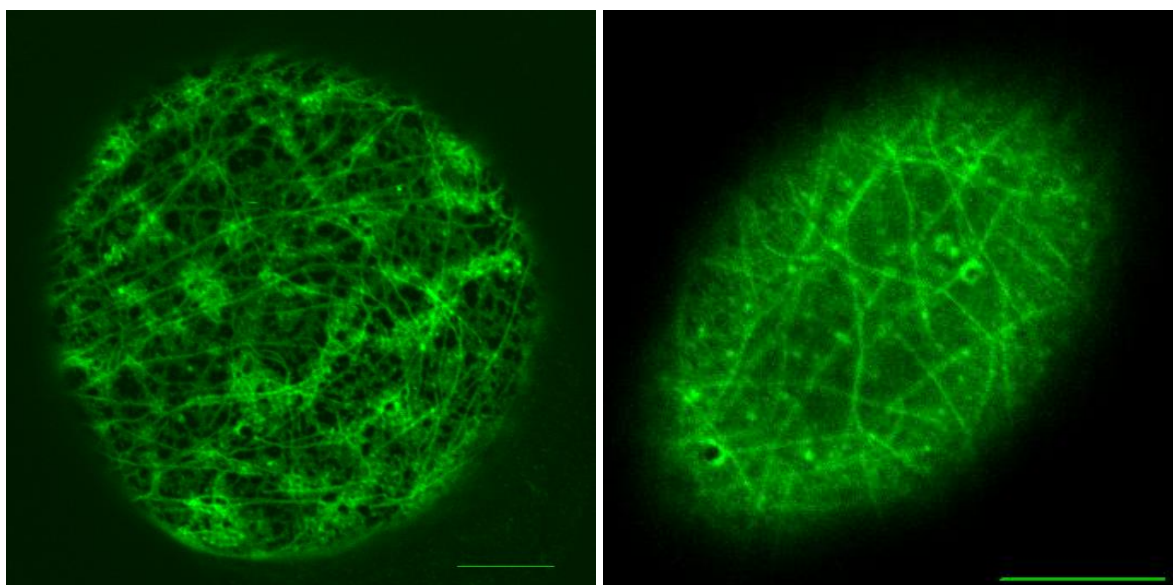
na to, že tento systém uchycení MT se vyskytuje obecně a v roce 1996 byl tento můstek identifikován u tabákových buněk BY-2 jako 90 kDa protein, později *in vitro* identifikovaný jako PLD δ (Gardiner *et al.*, 2001, Marc *et al.*, 1996). U PLD δ byly potvrzeny vazebné domény k tubulinu, ale u rostlin nebyla zatím interakce PLD δ s MT nikdy vizualizována.

Vizualizaci interakce fluorescenčně značených proteinů v živých buňkách lze realizovat několika paralelními přístupy, z nichž každý má určité výhody i nevýhody. V zásadě lze fluorescenčně značené markery pro PLD δ i MT transientně nebo stabilně exprimovat v buněčných kulturách nebo v rostlinách samotných. Všechny tyto metody byly využity během hledání optimálního řešení vizualizace interakce PLD δ a MT. Během kolokalizačních studií jsme se pokoušeli vizualizovat oba proteiny nebo jejich markery označené odlišně barevnými fluorescenčními proteiny. PLD δ byla značena zeleným fluorescenčním proteinem – GFP a plánovalo se použít i značku červenou (mCherry nebo RFP). Pro zobrazení mikrotubulů jsme použili značky přímo navázané na tubulin – zelený, GFP-tubulin $\alpha 6$ (TUA6) nebo červený, mCherry-tubulin $\alpha 5$ nebo značení nepřímé – červeně značená mikrotubuly vázající doména z MAP4 – RFP-MBD.

Studium zatím neznámé lokalizace proteinu představuje většinou mnoho přípravných prací (příprava a selekce transgenních linií) a směr dalšího postupu se ukáže až v průběhu práce, podle dosažených výsledků. Transformace rostlin a buněčných kultur je ve své podstatě vždy děj náhodný s nepředvídatelným výsledkem. Cílem není jeden experiment, ale hledání optimálního řešení vizualizace, což s sebou může, v průběhu práce, přinést i podstatné změny přístupu k problematice. Ve výsledcích proto popisují průběh celého procesu pokud možno chronologicky.

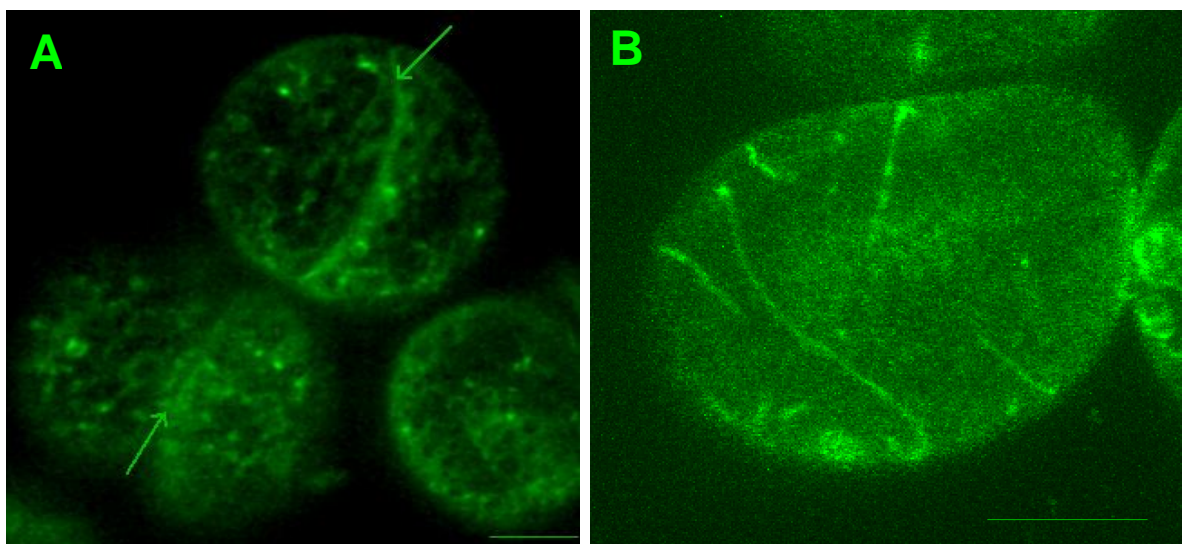
5.2.1. Studium *in vivo* lokalizace GFP-PLD δ v suspenzních kulturách BY-2 a *A. thaliana*

Protože biolistická metoda může poskytnout orientační výsledky již během dvou dnů, zvolili jsme na počátku právě tento přístup. Buněčná kultura *Nicotiana tabacum* – BY-2 je velmi robustní modelový systém (na rozdíl od suspenzní kultury *A. thaliana*), proto jsme experimenty začali provádět právě na ní. 16-20 h po transformaci začaly některé buňky syntetizovat fúzní protein GFP-PLD δ připomínající jednotlivé body lokalizované těsně pod plasmatickou membránou, v jiných buňkách GFP-PLD δ tvořila vlákna, která připomínala mikrotubulární cytoskelet (Obr. 17).



Obr. 17: Transientní exprese konstruktů *GFP-PLD δ* 20-24 h po biolisticke transformaci v BY-2. Třídenní buňky suspenzní kultury BY-2 exprimující *GFP-PLD δ* konstrukt uspořádaný do filament. Přibližně 4 μ m kortikální vrstvy pod plasmatickou membránou (po 400 nm krocích) byly pozorovány konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu. Jde o typický výsledek patnácti opakování. Měřítka odpovídá 10 μ m.

Náš zájem je orientován hlavně na děje probíhající v modelové rostlině *A. thaliana*, proto jsme transformovali suspenzní kulturu huseníčku, a to jak biolistickým přístupem (umožňujícím transientní expresi konstruktů), tak i pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (umožňující stabilní expresi konstruktů). Transientní transformace buněčné kultury huseníčku odhalila pouze výjimečně bodovou lokalizaci na cytoplasmatické membráně a většinou cytosolickou, nespecifickou lokalizaci GFP-PLD δ , kdežto v prvních dnech po stabilní transformaci buněk *A. thaliana* jsme pozorovali typickou bodovou lokalizaci GFP-PLD δ na plasmatické membráně a řídce se vyskytující filamentární uspořádání (Obr. 18), které bohužel po několika subkultivacích kultury nenávratně zmizelo a GFP signál se z membrány přesunul do cytosolu.

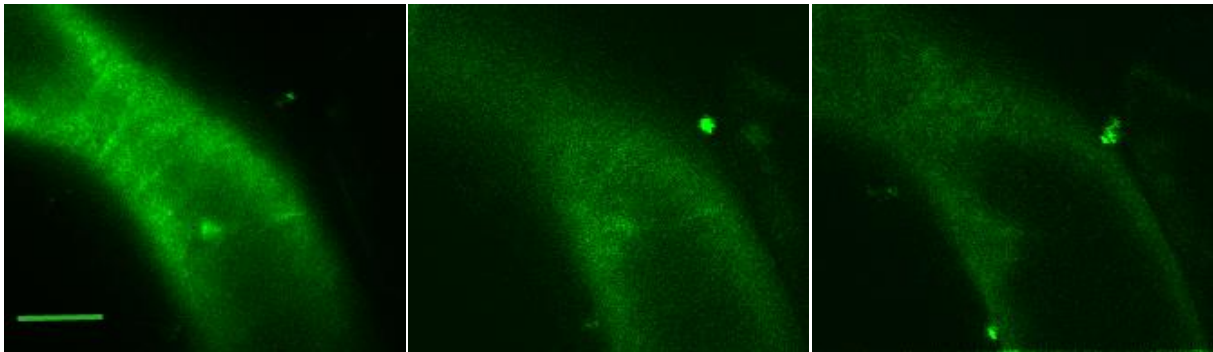


Obr.18: Expresse konstruktů *GFP-PLDδ* v buněčných suspenzních kulturách *A.thaliana*

Třídenní buňky suspenzní kultury po (A) transientní – biolistické a (B) stabilní transformaci genovým konstruktům *GFP-PLDδ*. (A) *GFP-PLDδ* signál vázaný k plasmatické membráně (šipka) a nespecificky k cytosolu. (B) *GFP-PLDδ* signál vázaný k cytoplasmatické membráně s náznaky filamentárního uspořádání. Přibližně 4 μm kortikální vrstvy pod plasmatickou membránou (po 400 nm krocích) bylo pozorováno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Obrázky znázorňují (A) jednu optickou rovinu, (B) projekci 5 obrázků. Měřítka odpovídá 10 μm .

Kvůli nespolehlivé a nespecifické lokalizaci *GFP-PLDδ* v buněčných kulturách huseníčku, jsme ověřování podstaty filamentárního uspořádání *GFP-PLDδ* dále prováděli na osvědčených BY-2 buňkách. Ale ani zde nebyla úspěšnost vysoká. Jednotlivé body připomínající exprese *GFP-PLDδ* byla spatřena ve stovkách buněk a filamentární uspořádání se podařilo zachytit asi u patnácti buněk.

Pro nepřímé ověření toho, že filamentární struktury tvořené *GFP-PLDδ* jsou vázány k mikrotubulárnímu cytoskeletu, jsme transformované buňky ošetřili herbicidní látkou – oryzalinem, který způsobuje rozpad mikrotubulů. Vlákňité struktury se rozpadly do 17 min po ošetření, což naznačuje, že jsou nějakým způsobem spojené s mikrotubuly a po jejich rozpadu se reorientují do difúzního, bodového uspořádání (Obr. 19). Experiment se podařil zopakovat pouze dvakrát z důvodu nízké četnosti buněk s filamenty tvořenými *GFP-PLDδ*. Pro další potvrzení propojení *GFP-PLDδ* s MT bylo proto nutné sledovat přímou kolokalizaci s expresí různobarevně značených proteinů *in vivo*.



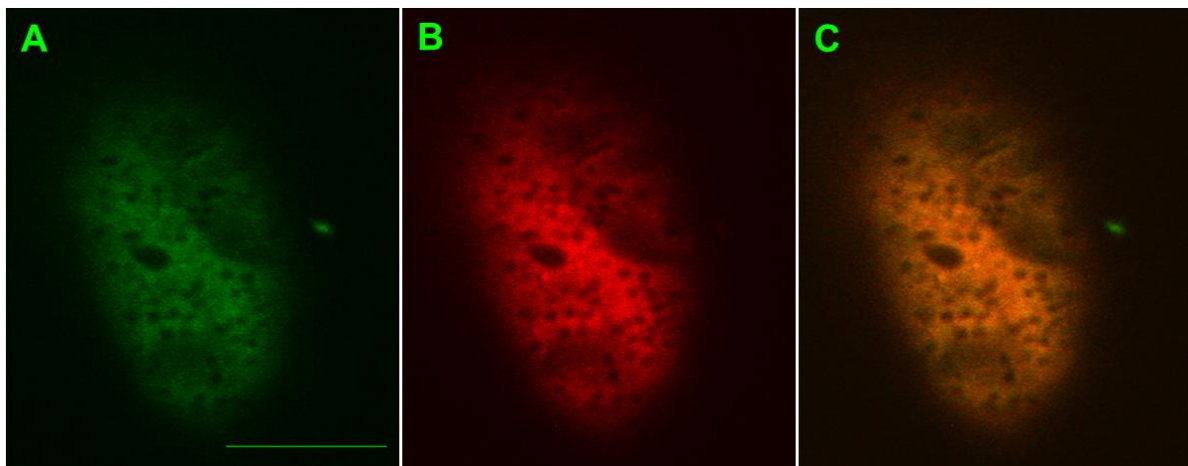
Obr. 19: Oryzalinem způsobený rozpad vláknitých struktur tvořených GFP-PLD δ v BY-2

Třídenní buňky suspenzní kultury BY-2 exprimující *GFP-PLD δ* genový konstrukt uspořádaný do filament. Oblast těsně pod plasmatickou membránou ve stejném místě buňky byla pozorována (A) před ošetřením, (B) 11 min a (C) 17 min po ošetření 20 μ M oryzalinem.

Snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu, výsledek odpovídá dvěma opakováním. Měřítka odpovídá 10 μ m.

Podobně byl uskutečněn i pokus o rozpad vláknitých struktur tvořených GFP-PLD δ za použití latrunkulinu B, který způsobuje úbytek aktinových filament. Po použití LatB zůstávaly vláknité struktury neporušené. Můžeme tedy předpokládat, že filamenta tvořená PLD δ kopírují spíše mikrotubulární a ne aktinový cytoskelet.

Výhoda biolistické metody spočívá v možnosti aplikovat do buněk najednou více genových konstruktů, kterými se pokryjí zlaté částice. Pokusili jsme se aplikovat do třídenních BY-2 buněk konstrukt GFP-PLD δ zároveň s MT markerem RFP-MBD. Výsledkem byla bohužel pouze cytosolická lokalizace obou signálů, což dokazuje Obr. 20 C, kde se signály z obou předchozích obrázků dokonale překrývají (Obr. 20).



Obr. 20: BY-2 buňky biolisticky transformované současně konstruktem pro GFP-PLD δ a RFP-MBD

Třídenní buňky suspenzní kultury BY-2 exprimující 16 h po transformaci (A) *GFP-PLD δ* genový konstrukt, pro vizualizaci fosfolipasy D δ (B) červeně značený MT marker RFP-MBD, (C) oba spojené předchozí obrázky. Snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss), sekvenčně. Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu, těsně pod plasmatickou membránou a jsou typickým výsledkem pěti opakování. Měřítka odpovídá 10 μ m.

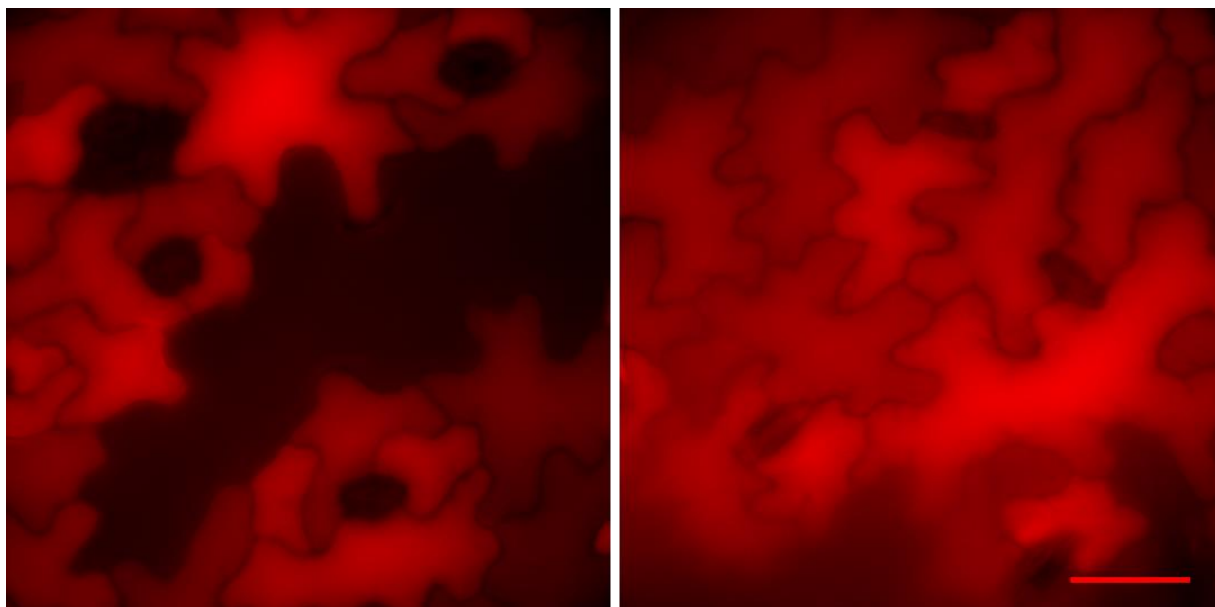
Biolistická transientní transformace využívá toho, že plasmidová DNA nemusí být nutně včleněna do genomu, ale stačí, když se zachytí v jádře, kde ji transkripční a později translační aparát v cytosolu buňky převede na protein. O úspěšnosti exprese rozhoduje kondice použitých buněk, velikost aplikovaného vektoru i velikost samotné translatované DNA. Velké vektory mohou rostlinné buňky (hlavně v suspenzních kulturách narozdíl od buněk, které jsou součástí rostliny) zatížit příliš a k úspěšné expresi proteinu nedojde nebo vzniká protein poškozený. Výhodou biolistického přístupu je rychlé získání výsledků, pro transformaci rostlin se nemusí používat binární vektory, lze takto transformovat i rostliny, u kterých se vyskytují potíže s používáním kmenů *A. tumefaciens* (například jednoděložné rostliny), s úspěchem se používá při transformaci embryí nebo organel buněk (Rao *et al.*, 2009).

5.2.2. Transgenní rostliny *A.thaliana* exprimujících mikrotubulární markery pro kolokalizační studie

Během kolokalizačních studií jsme měli v úmyslu použít kombinaci stabilní a transientní transformace rostlin, protože selekce dvojité stabilně transformovaných rostlin nebo jejich křížení je časově poměrně dost náročné. Navíc jsme zpočátku neměli k dispozici všechny potřebné vektory a přípravou a ověřováním se celý proces dost zpomaluje.

Představa byla taková, že se použijí rostliny stabilně transformované buď fluorescenčně značenými MT nebo PLD δ a gen pro druhý protein se bude vnášet biolisticky. Mezitím samozřejmě probíhaly přípravy genových konstruktů a stabilní transformace.

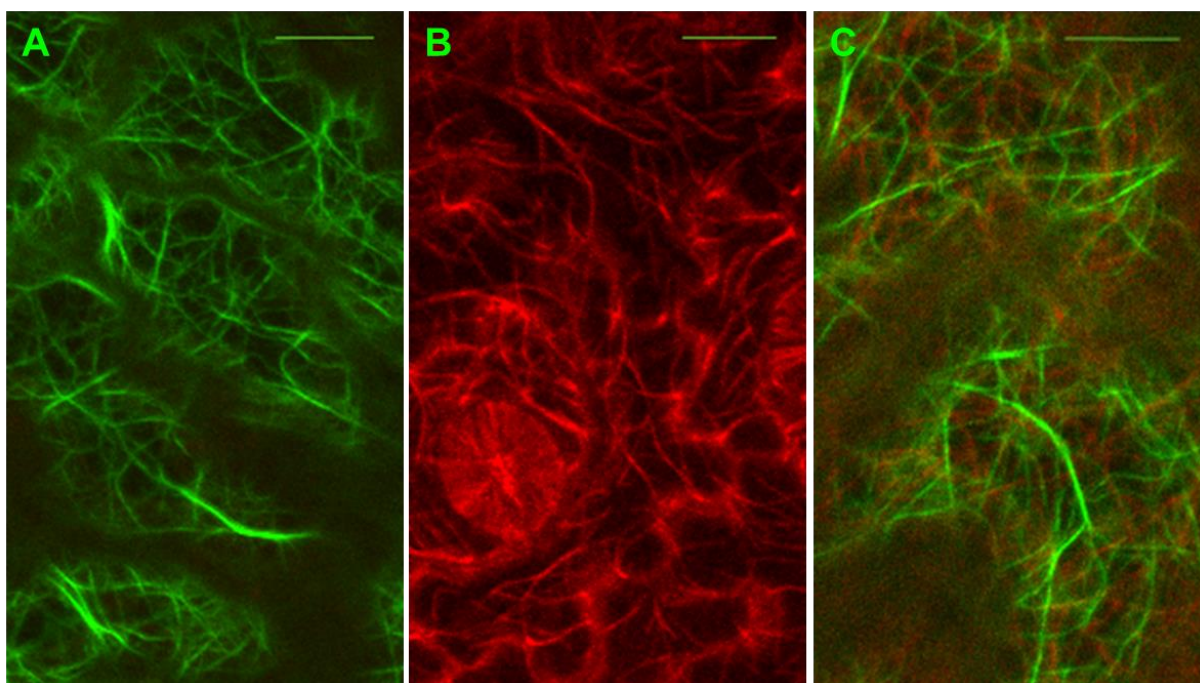
Začali jsme přípravou genových konstruktů *mCherry-TUA6* a *mCh-TUB6* pro vizualizaci červeně značených mikrotubulů. Ačkoliv klonování probíhalo dobře a všechny kontroly a sekvenace potvrdily, že ani jeden konstrukt nevykazuje mutace po transformaci rostlin a suspenzních kultur *A. thaliana* bohužel se objevil místo mikrotubulů pouze cytosolický signál s velmi řídkým výskytem naznačených mikrotubulů (Obr. 21).



Obr. 21: Cytosolický signál mikrotubulárního markeru *mCh-TUB6* v pokožkových buňkách listu stabilně transformovaných, 5-30 denních rostlin *A. thaliana*. Snímáno konfokálním skenovacím

mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu, těsně pod plasmatickou membránou a jsou typickým výsledkem třiceti opakování. Rostliny byly pěstovány nesterilně na zahradním substrátu v režimu krátkého dne. Měřítka odpovídá 10 μm .

Z časových důvodů jsme celý proces neopakovali, protože se nám podařilo získat rostliny *A. thaliana* dvojitě transformované konstrukty pro zeleně značený aktin (GFP-fABD) a červeně značené mikrotubuly (mCh-TUA5) (Sampathkumar *et al.*, 2011). Rostlinný materiál byl sice označen jako homozygotní linie, ale štěstí nám velmi přálo a my jsme kontrolou další generace rostlin zjistili, že to je heterozygot, který stále segreguje, takže jsme následující generací získali vlastně tři typy rostlin: linii exprimující GFP-fABD, linii exprimující mCh-TUA5 a linii dvojitě značenou GFP-fABD+mCh-TUA5, což nám ušetřilo mnoho práce a času (obr. 22). Linie *A. thaliana* s červeně značenými mikrotubuly mCh-TUA5 byla dále použita pro kolokalizační studie.

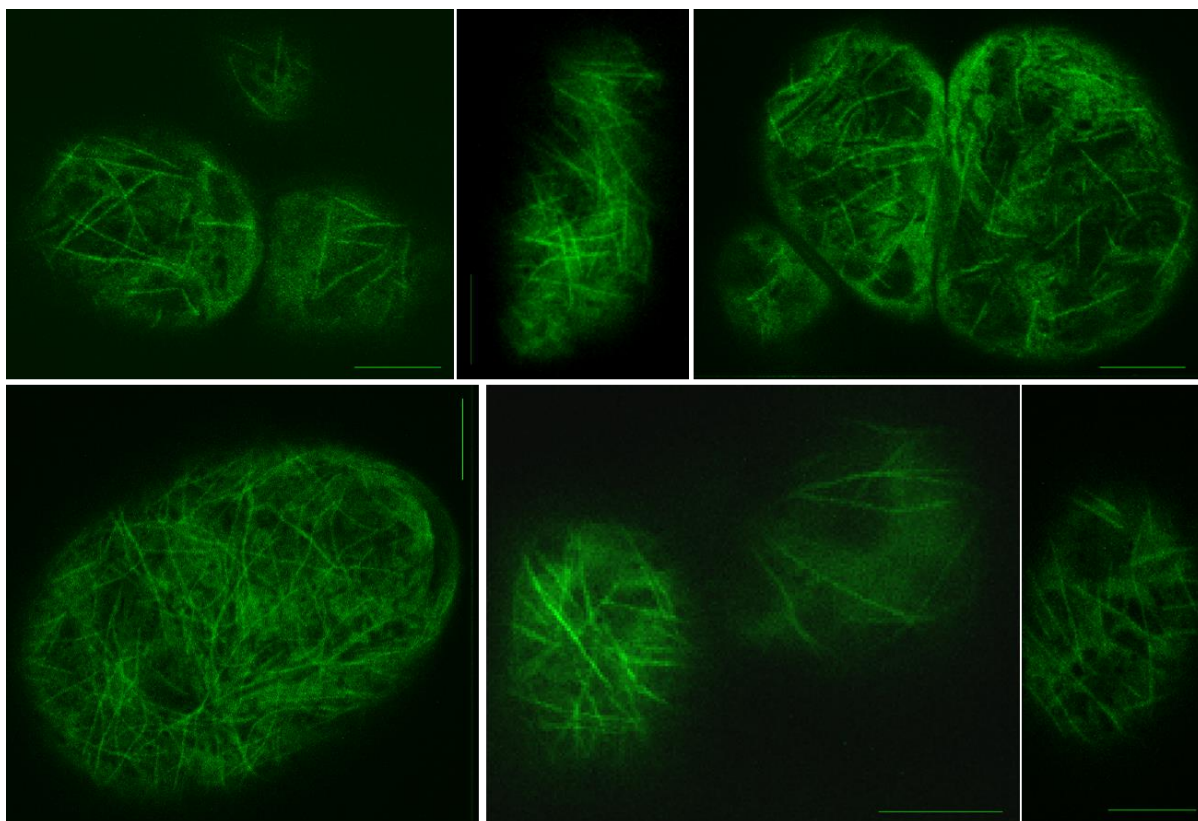


Obr. 22: Kortikální vrstva pokožkových buněk *A. thaliana* stabilně exprimující konstrukty *GFP-fABD* a/nebo *mCh-TUA5* (Sampathkumar *et al.*, 2011).

Uspořádání (A) aktinu – GFP-fABD a (B) tubulinu – mCh-TUA5 bylo pozorováno v kortikální vrstvě epidermálních buněk u abaxiální strany listu 5-30 denních rostlin *A. thaliana*, do hloubky 2 μm pod plasmatickou membránou u linií segregujících dědičné znaky pro jednotlivé konstrukty. (C) Homozygotní dvojitě značená linie stabilně exprimující *GFP-fABD* a *mCh-TUA5*. Rostliny byly pěstovány nesterilně na zahradním substrátu v režimu krátkého dne. Snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss), obrázky znázorňují jednu optickou rovinu, těsně pod plasmatickou membránou a jsou typickým výsledkem dvou set opakování. Měřítka odpovídá 10 μm .

Zároveň s tím jsme se pokoušeli o stabilní transformaci suspenzních kultur *A. thaliana* s použitím binárního vektoru nesoucího konstrukt *mCh-TUB6*, ale buňky nebyly životaschopné ani při jednom z pěti opakování. Použili jsme proto opačný postup a pokusili se z rostliny stabilně transformované markerem pro značení mikrotubulů *A. thaliana* *GFP-TUA6*

odvodit kalusové a později suspenzní kultury. Během pokusů jsme úspěšně použili enzymy pektolyasu a polygalakturonasu, které rozvolňují střední lamelu mezi buňkami a vedou k lepší rozpádatosti kalusů, které jsou právě v případě huseničky velmi soudržné. Po roce práce se nám podařilo odvodit velmi pěknou kulturu, která exprimovala zeleně značené mikrotubuly (GFP-TUA6) a byla připravena k následným kolokalizačním studiím (Obr 23). Nedlouho potom, co kultura byla již stabilní a vykazovala velmi pěknou expresi konstruktů *GFP-TUA6*, došlo k výpadku elektrického proudu a kultura zahynula. Takže pro kolokalizační studie byla k dispozici pouze rostlina *A. thaliana* s červeně značeným mikrotubulárním markerem *mCh-TUA5*.



Obr 23: Expres konstruktů *GFP-TUA6* v buněčných suspenzních kulturách *A. thaliana*.

Třídenní buňky suspenzní kultury odvozené z rostliny stabilně transformované markerem pro značení mikrotubulů *A. thaliana GFP-TUA6* byly snímány v oblasti kortikální vrstvy konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Jde o typickou lokalizaci mikrotubulů u většiny pozorovaných buněk, obrázky znázorňují jednu optickou rovinu. Měřítka odpovídá 10 μm .

5.2.3. Studium *in vivo* lokalizace GFP-PLD δ a kolokalizace s mikrotubulárními markery v rostlinách *Arabidopsis thaliana*

Před začátkem kolokalizačních experimentů zjišťujících umístění fosfolipasy δ D vůči mikrotubulům v buňkách bylo nutné selektovat homozygotní linii rostlin *A. thaliana* GFP-PLD δ a mikroskopicky ověřit stabilitu, homogennost a hlavně způsob, jakým je fúzní protein GFP-PLD δ lokalizován v buňkách rostliny.

Z celkem pěti linií rostlin *A. thaliana*, ekotyp Col-0 generace T₀, transformovaných prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* konstruktem *35S::GFP-PLD δ* v plasmidu

pK7WGF, bylo vyseto a selektováno přibližně 9000 semen ze tří po sobě následujících generací. U přibližně 800 z nich byla ověřena exprese screeningem pomocí konfokální mikroskopie *in vivo*.

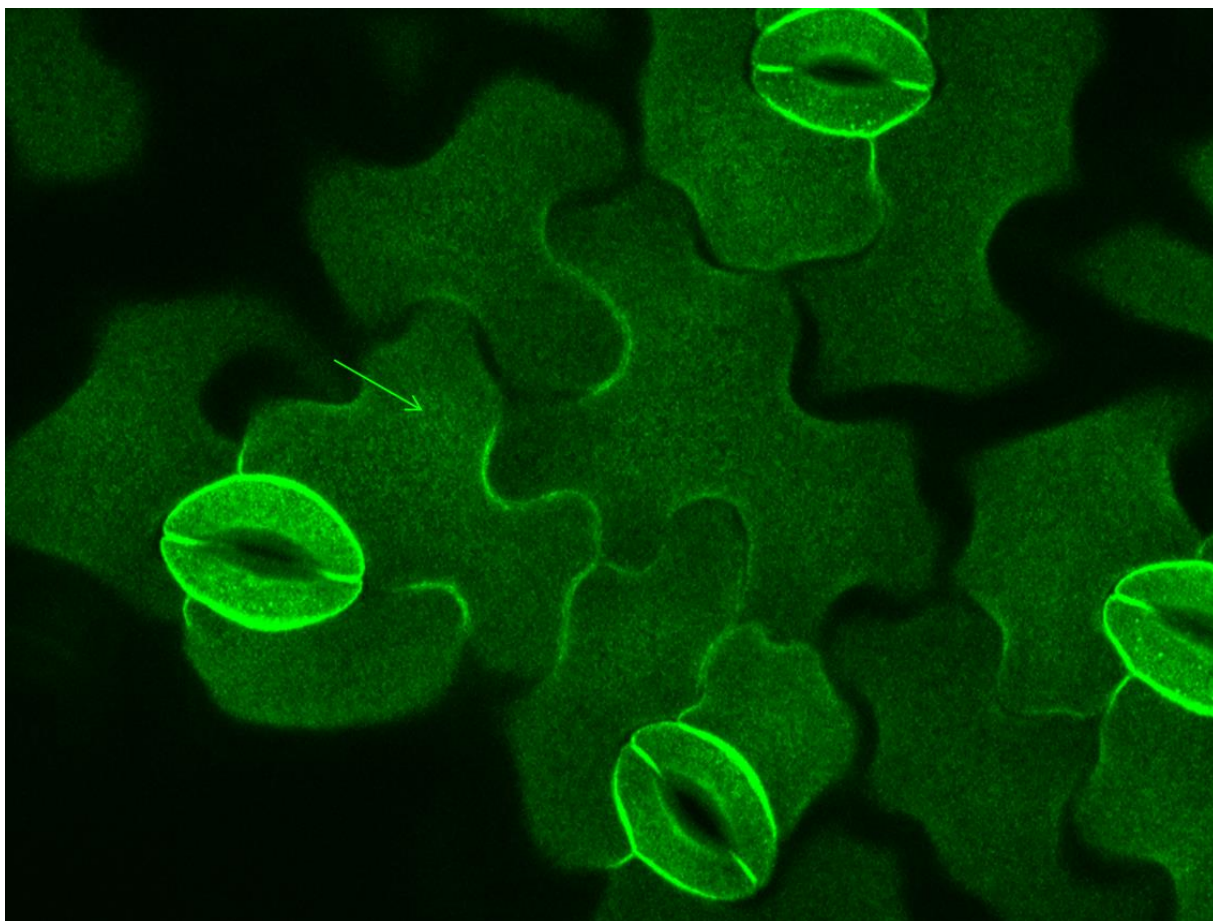
Zjistili jsme, že přibližně jedna třetina všech pozorovaných rostlin T₁ generace, přestože pravděpodobně byly transformovány, protože nehynuly na selekčním mediu s kanamycinem, neexprimuje fúzní protein GFP-PLD δ v pozorovatelném množství. Současně bylo pozorováno, že u rostlin, kde byl GFP-PLD δ mikroskopicky viditelný, došlo k zhasínání GFP-PLD δ exprese přibližně po třech týdnech od vysetí, což mohlo být způsobeno umlčováním exprese konstruktů.

V T₂ generaci se objevily dvě linie rostlin, jejichž semena vyklíčila na mediu s kanamycinem ve 100% případech, je tedy velmi vysoká šance, že se jedná o homozygotní transformanty. U obou linií se u všech rostlin projevilo umlčování exprese po přibližně třech týdnech, avšak další generace, kde byla použita semena z rostlin s umlčenou expresí, následně opět expresi daného konstruktů vykazovala. Proto byly dané linie použity ke kolokalizačním studiím a zároveň byl neustále prováděn mikroskopický screening u dalších linií T_{2 a 3} generace, které byly 100% rezistentní k selekčnímu markeru kanamycinu a sledována lokalizace PLD δ , zároveň bylo sledováno, zda a kdy k umlčení exprese dochází.

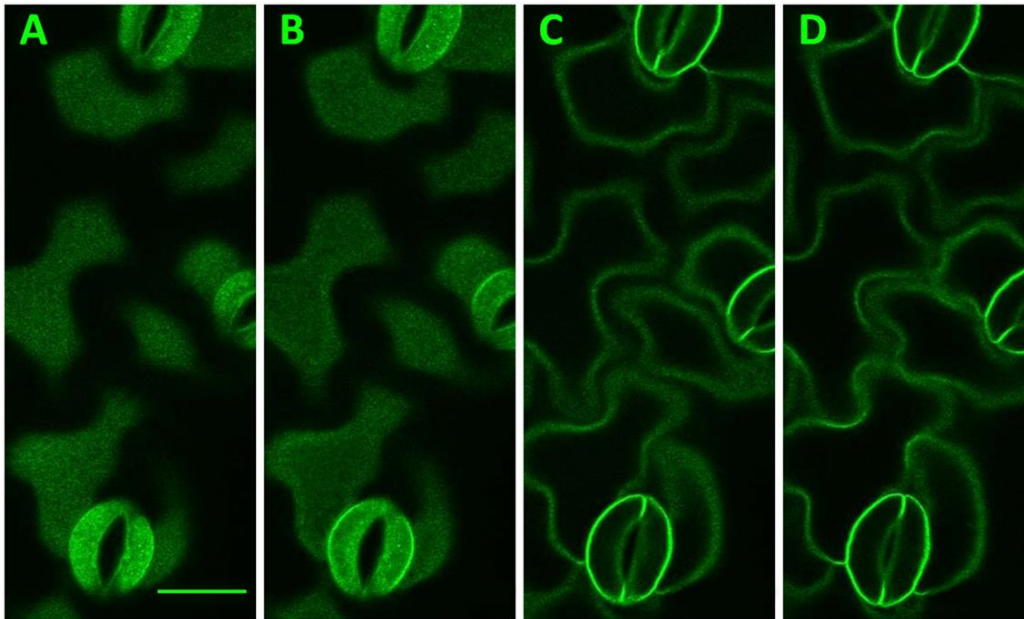
Lokalizace PLD δ byla podrobně sledována konfokálním skenovacím nebo „spinning disk“ (SDCM – spinning disk confocal microscope) mikroskopem v rostlinách *A. thaliana* stabilně exprimujících fúzní protein GFP-PLD δ . Během více než dvou let experimentu bylo při kontrole lokalizace nasnímáno asi tři tisíce obrázků a pořízeny stovky snímků. Nejčastěji jsme pozorovali PLD δ lokalizovanou těsně pod plasmatickou membránou v jemných bodech, které vykazovaly rychlou dynamiku a přechodně se seskupovaly do filamentárních struktur, které se ihned rozpadaly. Zřídka bylo možné vidět tato filamenta na projekcích několika snímků najednou (Obr. 24).

Nejlépe se osvědčilo snímání prvního obrázku v úrovni plasmatické membrány a další snímky byly pořizovány v odstupech 100-400 nm směrem do nitra buňky. Tímto postupem jsme zjistili, že PLD δ se vyskytuje na plasmatické membráně a asi 400-600 nm pod ní (Obr. 25).

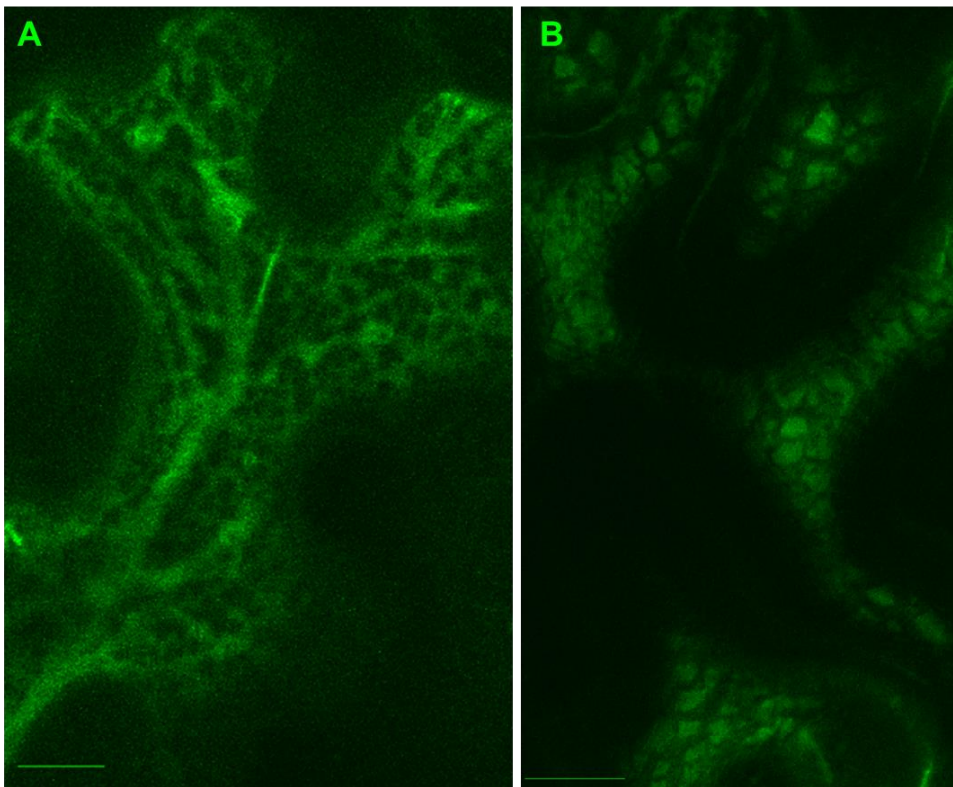
Ojediněle se objevila netypická, velmi stabilní lokalizace, která buď připomínala endomembránový systém buňky nebo nepřipomínala vůbec nic z toho, co bylo v buňkách zatím spatřeno (Obr. 26). Dalším ojedinělým uskupením, které PLD δ tvořila, byly vláknité struktury, které se lišily od těch, které se vyskytovaly přechodně, během rychlé dynamiky bodově lokalizované PLD δ . Tato vlákna se v průběhu desítek minut téměř neměnila a svým uspořádáním připomínala transverzálně uspořádané mikrotubuly (Obr. 27).



Obr. 24: Lokalizace PLD δ v rostlinách *A. thaliana* stabilně exprimujících fúzní protein GFP-PLD δ . Projekce 4 snímků z různých optických rovin zachycuje dynamickou, bodovou lokalizaci GFP-PLD δ , šipka označuje místo kde se body přechodně formují do filamentárních struktur. 5-30denní rostliny byly pěstovány sterilně na ARA mediu v režimu krátkého dne. Obrázky byly pořízeny konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Obrázek je typickým výsledkem přibližně šesti set opakování. Měřítka odpovídá 10 μ m



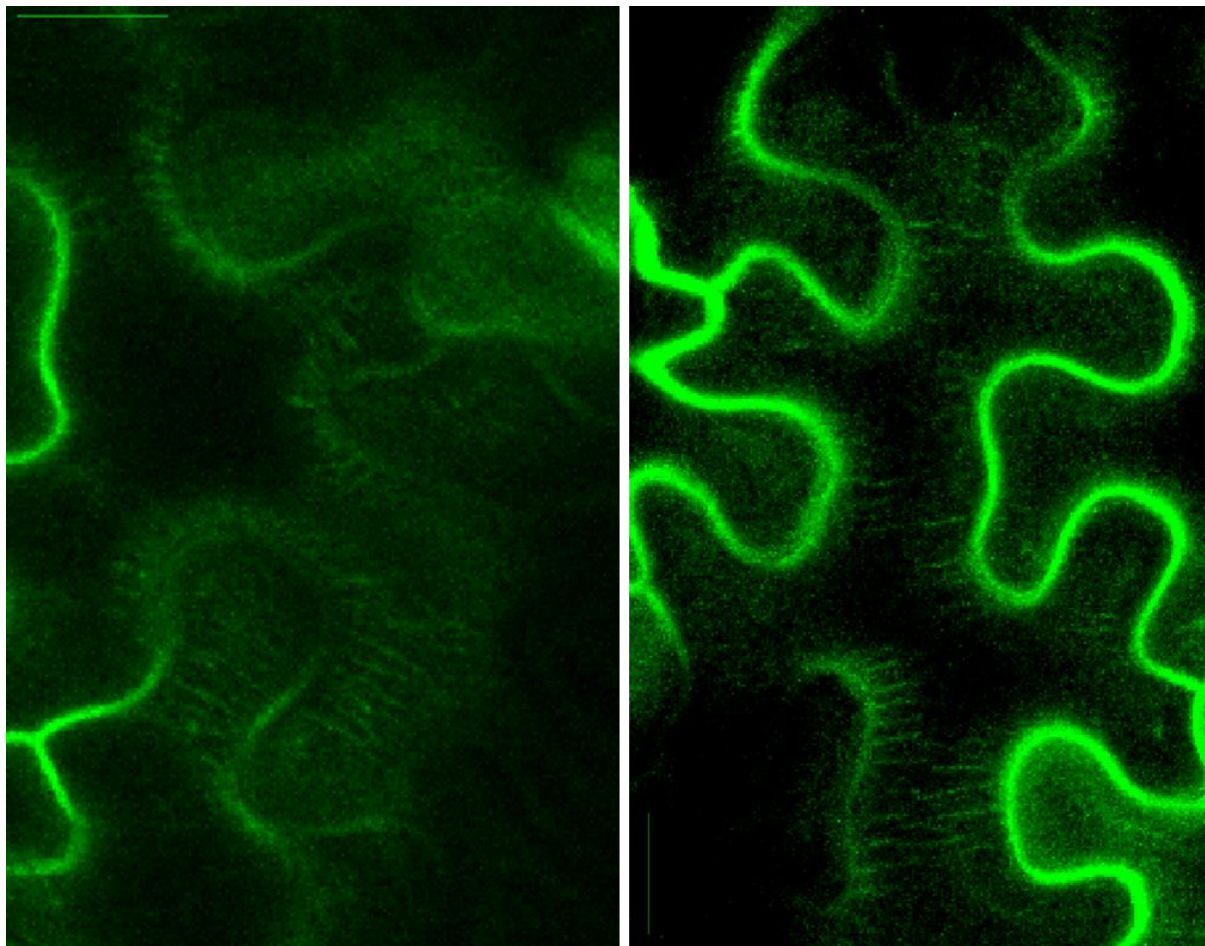
Obr. 25: Bodová lokalizace PLD δ v rostlinách *A. thaliana* stabilně exprimujících fúzní protein GFP-PLD δ . Panely A-D představují sérii snímků stejného místa na abaxiální straně listu v různé hladině ostrosti, snímané od plazmatické membrány (A) ve vzájemném odstupu 400 nm směrem do nitra buňky (B-D). PLD δ se vyskytuje na plazmatické membráně asi 400-600 nm pod ní. 5-30denní rostliny byly pěstovány sterilně na ARA mediu v režimu krátkého dne. Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu a byly pořízeny konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Měřítka odpovídá 10 μ m



Obr. 26: Atypická lokalizace PLD δ v rostlinách *A. thaliana* stabilně exprimujících fúzní protein GFP-PLD δ . GFP-PLD δ bylo lokalizováno v některých případech pod plazmatickou membránou ve

vzoru připomínající endomembránové struktury (A). Lokalizace PLD δ na plasmatické membráně (B) neodpovídá žádné dosud spatřené lokalizaci proteinu v buňkách.

Obrázky znázorňují optickou rovinu na a těsně pod plasmatickou membránou a jsou výsledkem deseti (A) a dvou (B) opakování. 5-30denní rostliny byly pěstovány sterilně na ARA mediu v režimu krátkého dne. Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu, byly snímány konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Měřítka odpovídá 10 μ m.

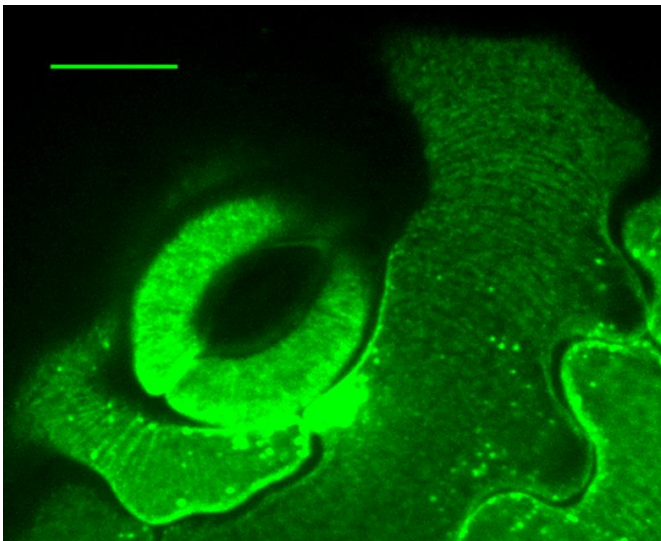


Obr. 27: Vlákňité struktury PLD δ v pokožkových buňkách listu *A. thaliana*.

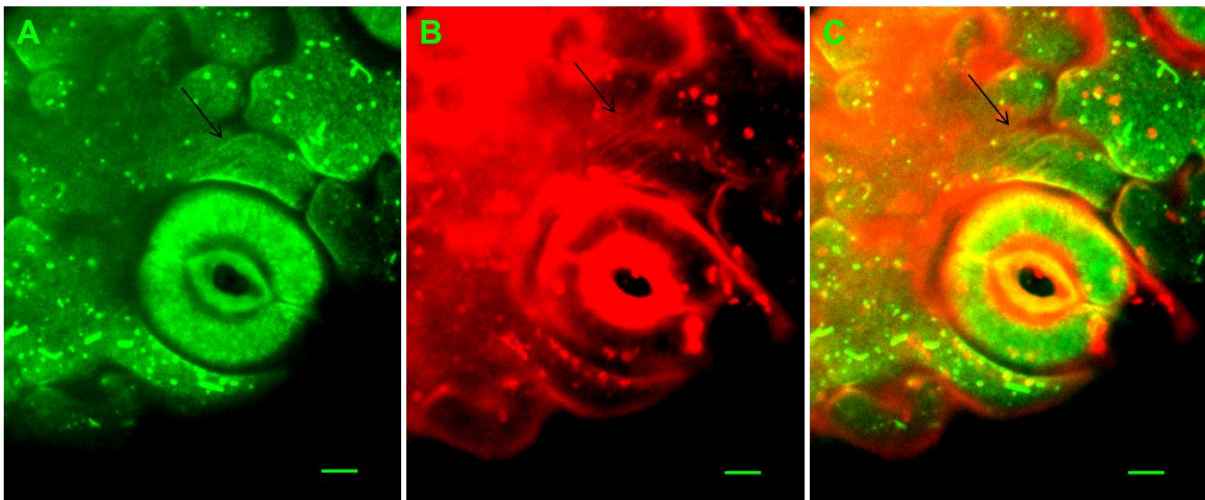
Fúzní protein GFP-PLD δ lokalizovaný pod plasmatickou membránou v stabilních vlákňitých útvech, které svým charakterem připomínají transversálně uspořádané MT. Na obrázku je vidět i typická bodová lokalizace kopírující plasmatickou membránu (viditelné okraje buněk). Obrázky znázorňují jednu optickou rovinu těsně pod plasmatickou membránou a jsou typickým výsledkem pěti opakování. 5-30denní rostliny byly pěstovány sterilně na ARA mediu v režimu krátkého dne. Byly snímány konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Měřítka odpovídá 10 μ m

Někdy se objevovala podlouhlá filamenta velmi blízko sebe, což je pro MT opravdu netypické (Obr.28). Vlákna se objevila v několika listech podobného stáří najednou, což nás vedlo k myšlence sledovat rostliny v průběhu jejich vývoje systematicky. Zjistili jsme, že podobné uspořádání PLD δ nesouvisí s vývojem celé rostliny, ale s vývojovým stadiem jednotlivých listů, filamentární uspořádání se s větší četností objevovalo u listů o velikosti 3-5 mm. Ne zcela typické mikrotubulární uspořádání a stabilita těchto struktur nás vedlo

k myšlence, že může jít o zvrásnění membrány. K důkazu propojení filamentárních struktur a membrány jsme použili fluorescenční barvivo FM4-64, které se přednostně lokalizuje na membráně a skutečně se lokalizace na membráně potvrdila (Obr.29).



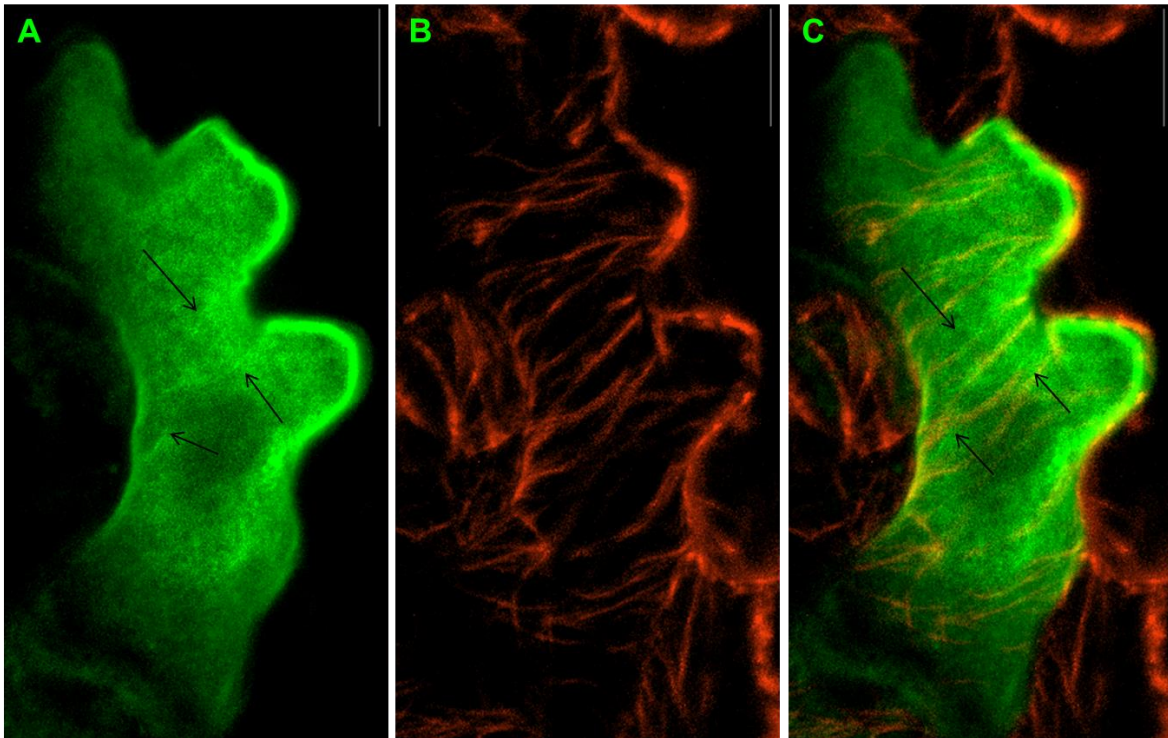
Obr. 28: Vláknitá lokalizace PLDδ v pokožkových buňkách listu *A. thaliana*. Stabilně exprimovaný protein GFP-PLDδ je zde uspořádaný způsobem, který připomíná paralelně lokalizovaná filamenta v denzitě, která již však není typická pro MT. Rostliny byly pěstovány nesterilně na zahradním substrátu v režimu krátkého dne. Snímky byly pořízeny „spinning disk“ mikroskopem (Olympus IX81-Andor SDCM) a znázorňují projekci 5 snímků z různých optických rovin. Měřítka odpovídá 10 μm



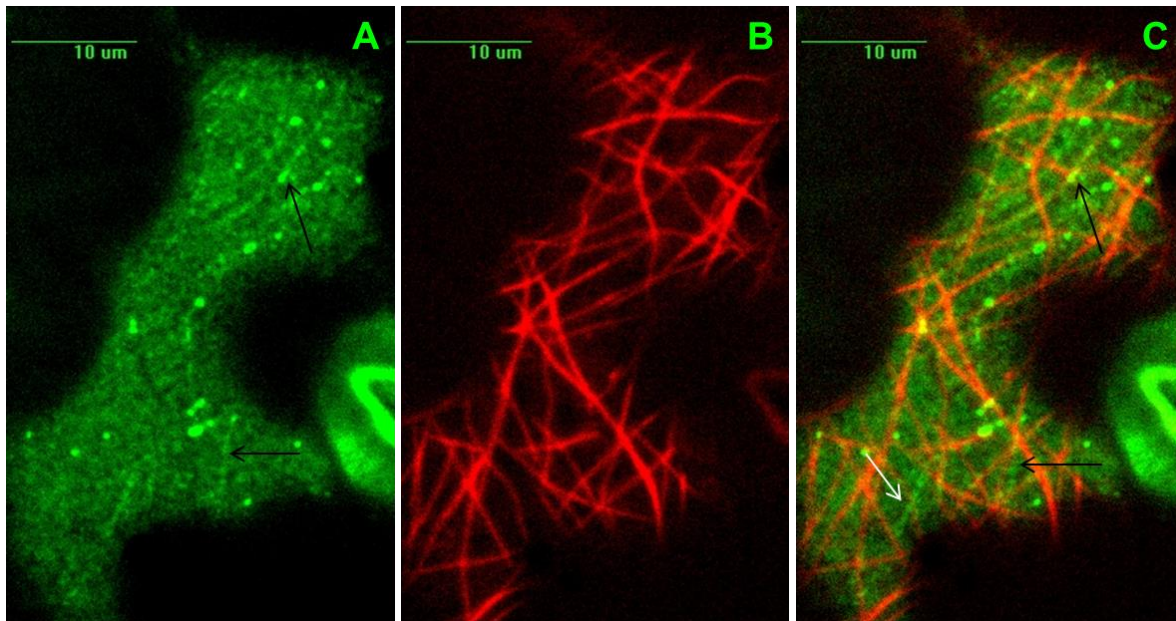
Obr. 29: Kolokalizace vláknitých struktur GFP-PLDδ s fluorescenčním barvivem FM4-64 pro specifické značení plasmatické membrány. Pokožkové buňky listu *A. thaliana* stabilně exprimující bodově lokalizovanou GFP-PLDδ (A), lokalizace fluorescenčního barviva FM4-64 (B). Sloučené oba předchozí obrázky (C). Černá šipka na panelech A, B i C označuje významnou kolokalizaci červeného a zeleného signálu, vláknitého charakteru. Rostliny byly pěstovány nesterilně na zahradním substrátu v režimu krátkého dne. Snímky byly pořízeny „spinning disk“ mikroskopem (Olympus IX81-Andor SDCM) a znázorňují projekci 5 snímků z různých hladin ostrosti. Měřítka odpovídá 10 μm

K potvrzení přímého, ale i nepřímého propojení PLDδ bylo nezbytné uskutečnit ještě kolokalizační studii. Byly použity dva přístupy. Nejprve jsme do listů rostlin *A. thaliana* stabilně exprimujících mikrotubulový marker mCh-TUA5 biolisticky vnašeli GFP-PLDδ

konstrukt. V tomto případě se ukázala kolokalizace některých filamentárních struktur tvořených PLD δ s mikrotubuly (Obr. 30). Použití opačného přístupu, kdy se do listů rostlin *A. thaliana* stabilně exprimujících GFP-PLD δ biolisticky vnášel mikrotubulární marker *RFP-MBD* (microtubule binding domain z humánního MAP4), následoval větší výskyt filamentárních struktur tvořených GFP-PLD δ (Obr. 31), ale v obou případech se vyskytovaly filamentární struktury, které se překrývaly s mikrotubuly. Byly však i takové, které dráhu mikrotubulů nekopírovaly.



Obr. 30: Kolokalizace (C) vláknitých struktur biolisticky vneseného GFP-PLD δ (A) a stabilně exprimovaného mikrotubulového markeru mCh-TUA5 (B) v pokožkových buňkách abaxiální strany listu *A. thaliana*. Místo kolokalizace obou fúzních proteinů (C) a místo vláknitého uspořádání GFP-PLD δ (A) ukazují černé šipky. Obrázky znázorňují optickou rovinu těsně pod plasmatickou membránou a jsou typickým výsledkem padesáti opakování. Snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss). Rostliny byly pěstovány nesterilně na zahradním substrátu v režimu krátkého dne. Měřítka odpovídá 10 μ m



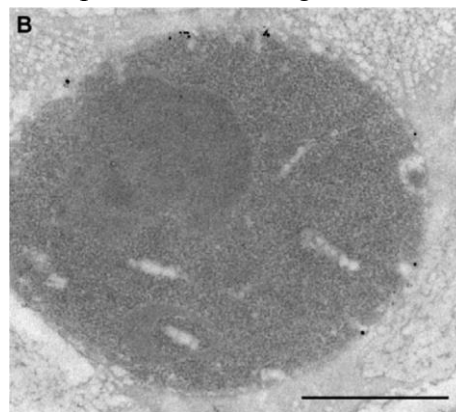
Obr. 31: Kolokalizace (C) vláknitých struktur stabilně exprimovaného GFP-PLD δ (A) a biolisticky vneseného mikrotubulového markeru mCh-TUA5 (B) v pokožkových buňkách na abaxiální straně listu *A. thaliana*. Černé šipky (C) označují kolokalizaci mezi vláknitými strukturami GFP-PLD δ a červeně značeného tubulinu mCh-TUA5 a vláknité uspořádání GFP-PLD δ signálu (A), bílá šipka označuje vlákno tvořené GFP-PLD δ bez kolokalizace s mikrotubuly. Obrázky znázorňují optickou rovinu těsně pod plasmatickou membránou a jsou typickým výsledkem padesáti opakování. Rostliny byly pěstovány nesterilně na zahradním substrátu v režimu krátkého dne. Obrázky byly snímány „spinning disk“ mikroskopem (Olympus IX81-Andor SDCM). Měřítka odpovídá 10 μ m

Z výsledků je tedy patrné, že struktury tvořené GFP-PLD δ se vyskytují na plasmatické membráně, ale přímá vazba na mikrotubuly není zcela prokázána. Mohli bychom zde použít analogii s terminálními komplexy, které jsou umístěné v plasmatické membráně a tvoří celulosové mikrofibrily směřující do apoplastu během růstu buněk. Terminální komplexy se pohybují podél mikrotubulů, nejsou s nimi spojeny přímo, ale přes další proteiny (Bringmann *et al.*, 2012). Experimenty *in vitro* bylo totiž zjištěno, že PLD δ má v *A. thaliana* několik interakčních partnerů: aktin (ACT7), různé druhy heat shock proteinů (HSP), různé typy ATPsynthas, tubulin (TUB2, 3, 4, 8 a 9), clathriny a homolog flotilinu, což je protein typicky lokalizovaný v lipidových raftech (Borner *et al.*, 2005, Ho *et al.*, 2009). Přímá vazba k mikrotubulům tedy může být přítomná po velmi krátkou dobu (námi pozorovaná přechodně vznikající filamenta během velmi rychlé dynamiky bodů tvořených GFP-PLD δ na plasmatické membráně). Tato vazba by mohla být regulována např. fosforylací nebo defosforylací PLD δ na serinových nebo threoninových zbytcích jako u PIP2 dependentních fosfolipas (Novotna *et al.*, 2003).

Naopak námi pozorované nedynamické filamentární struktury tvořené GFP-PLD δ by mohly být na cytoskelet vázány nepřímo, právě v oblasti lipidových raftů, protože se zcela jistě váží k plasmatické membráně. Souvislost s homologem flotilinu – markerem lipidových raftů – není jistě náhodná, protože lipidové rafty jsou místem zvýšené signalizace na plasmatické membráně, stejně jako PLD δ je v signalizaci významně zapojena (Ho *et al.*, 2009, Malinsky *et al.*, 2013).

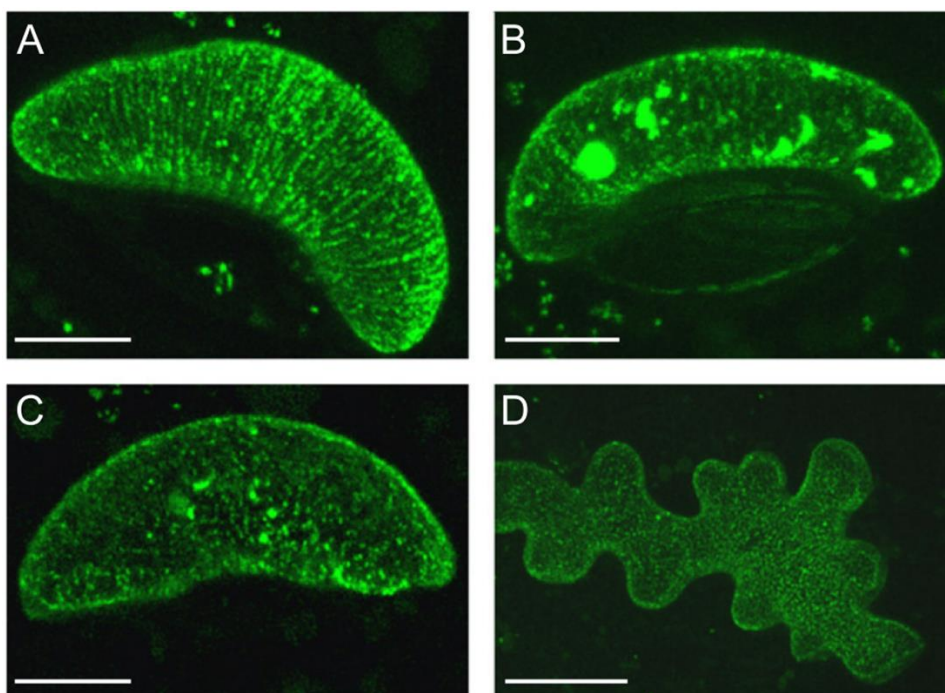
U živočišných buněk a kvasinek se ukázalo, že plasmatická membrána je rozdělena na malá políčka – rafty o průměru 20-70 nm, která mají specifické složení: glykosfingolipidy a cholesterol u živočišných buněk a ergosterol u kvasinek a sitosterol, kampesterol, méně stigmasterol a cholesterol a další deriváty u rostlin (Liu *et al.*, 2009). Typickou postranlační modifikací proteinů umístěných na lipidových raftech je glykosylfosfatidylinositolová kotva (GPI), kterou se proteiny upevňují k plasmatické membráně (Borner *et al.*, 2005). Hranice raftů často kopírují cytoskeletální filamenta probíhající pod membránou, políčka jsou vysoce dynamická (u živočichů) a díky specifickým proteinům i specifickému složení fosfolipidů, které je obklopují, mají často různorodou signální funkci (Oda *et al.*, 2012). Políčka bývají lokalizována buď v rovině plasmatické membrány nebo tvoří prohlubně – invaginace plasmatické membrány podobné baňkám (kaveoly v nervové tkáni živočišných buněk) nebo trubicím (eisosomy u kvasinek) (Obr. 32) (Malinsky *et al.*, 2013, Nicolson 2014, Strádalová *et al.*, 2009).

Obr. 32: Trubicové vchlípení plasmatické membrány u kvasinky *Saccharomyces cerevisia*. Trubicové invaginace plasmatické membrány – eiosomy jsou náhodně distribuovány po povrchu kvasinky (Strádalová *et al.*, 2009).



Struktury zmíněné u *S. cerevisiae* nápadně připomínají filamenta tvořená GFP-PLD δ u suspenzních kultur *A. thaliana* (Obr. 18). Tato políčka dostala, podle souvislostí s jejich nálezem a funkcí, různé názvy: lipidové rafty, membránové mikrodomény, detergent-rezistentní (nerozpustné) membrány (DRM – detergent-resistant membrane, DIM – detergent-insoluble membranes). Studium lipidových raftů je technicky náročné, protože je nutno izolovat pouze malé, difuzně rozseté oblasti plasmatické membrány. Ačkoliv je izolace těchto mikrodomén historicky spojena s používáním detergentních činidel (Triton-X100, SDS, CHAPS), je to postup poněkud zavádějící, protože bylo zjištěno, že mnoho proteinů izolovaných tímto způsobem patří do jiných buněčných kompartmentů než do plasmatické membrány. Navíc se mohou velké proteinové komplexy rozpadnout a ztratit v cytosolické frakci. Šance zachytit takto proteiny vázané periferně k PM (jako je třeba PLD δ) je ještě menší. Je tedy nutné tento postup doplnit o afinitní chromatografii nebo imunoprecipitační postupy nebo použít metodu fluorescenčního značení zkoumaných proteinů a *in vivo* přímo pozorovat. Metoda „live imaging“ s použitím různých způsobů zobrazení a mikroskopických technik (Liu *et al.*, 2009) se v rostlinné biologii velmi osvědčila, protože přímo vypovídá o biologické funkci konkrétních studovaných proteinů a jejich interakcích. Například expresí konstruktů zeleného fluorescenčního proteinu a proteinu pro cytoplasmatický draslíkový kanál (GFP-KAT1) bylo znovu potvrzeno, že rostlinné mikrodomény jsou mnohem méně dynamické než mikrodomény v živočišných buňkách a také kopírují cytoskeletární dráhy (Obr. 33). U rostlin bylo zatím zjištěno, že několik integrálních proteinů (H⁺, Ca²⁺ ATPasa, akvaporin PIP2;1, exportní protein pro auxin – PIN2, transportéry hexos atd.) a některé periferní (flotiliny, remorin) se v plasmatické membráně shlukují do oddělených skupinek, velikostí odpovídajících uvedeným mikrodoménám a byla pozorována i změna složení těchto

mikrodomén například po působení patogenních nebo symbiontních mikroorganismů na rostlinu (Borner *et al.*, 2005, Homann *et al.*, 2007, Malinsky *et al.*, 2013, Sutter *et al.*, 2006). Homannem popsaná nízká dynamika těchto domén u rostlin i nápadná podobnost obrázků 28 a 33, mohou vést k domněnce, že námi pozorovaná lokalizace GFP-PLD δ odpovídá lokalizaci v lipidových mikrodoménách, kde se může přímo účastnit na jejich tvorbě (Pinosa *et al.*, 2013) a je nepřímo spojená s kortikálními mikrotubuly např. prostřednictvím dalších proteinů (Ho *et al.*, 2009).



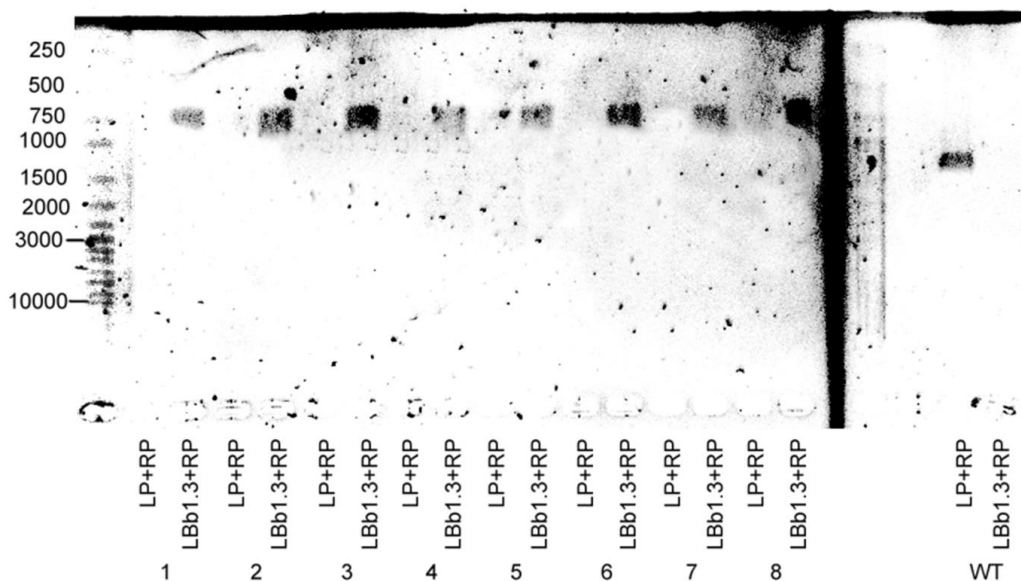
Obr. 33: Uspořádání draselných vtokových kanálů KAT1. V pokožkových a svěračích buňkách *Vicia faba* jsou distribuovány proteiny KAT1-GFP v plazmatické membráně do jednotlivých bodů, místy vytvářejících filamentární struktury. Podle Homannové se shromažďují v místech lipidových raftů, do nichž se přirozeně integrují. Měřítka odpovídá 10 μ m (Homann *et al.*, 2007).

5.3. Časné změny mikrotubulárního cytoskeletu po působení solného stresu

Cílem této části práce bylo prokázat propojení fosfolipidové dráhy a cytoskeletu během solného stresu u rostlin *A. thaliana*. Úloha různých isoform fosfolipasy D při stresu ze zasolení byla mnohokrát dokázána. Propojení PLD δ a mikrotubulů je téma velmi diskutované, avšak zdaleka ne vyřešené. Porovnáním odezvy mikrotubulů při solném stresu u mutantních rostlin huseníčku, které mají vyřazenou činnost PLD δ a u rostlin divokého typu (WT), které mají funkci PLD δ neporušenou, chceme doložit existenci a důležitost propojení PLD δ s mikrotubuly při působení solného stresu.

K pokusům byly používány rostliny *A. thaliana*, Col-0 WT a mutanti *pld δ* SALK 023247, kde je inzercí T-DNA z *Agrobacterium tumefaciens* do genu kódujícího PLD δ vyřazena jeho funkce.

Nejprve bylo ověřeno genotypizací, že inzerční mutanti *pld δ* jsou homozygotní linie a gen je nefunkční. (Obr. 34).

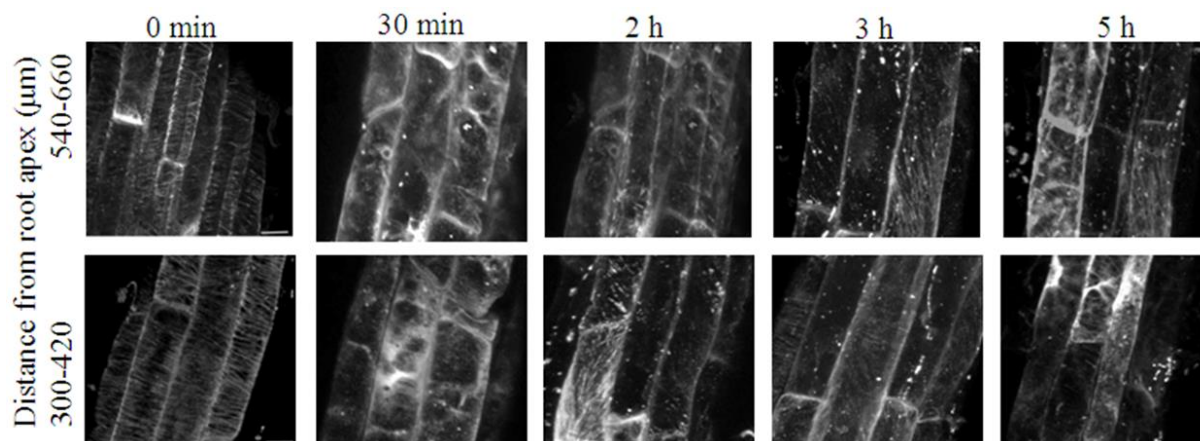


Obr. 34: Genotypizace mutantních linií *Arabidopsis thaliana pldd* SALK 023247

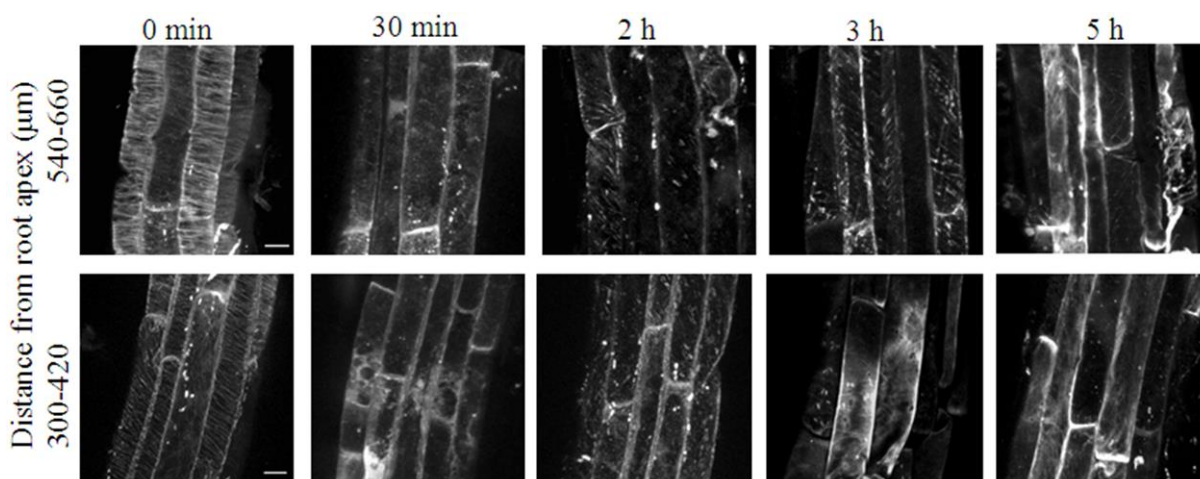
Gel zobrazuje bandy DNA rostlin *A.thaliana* WT a jednotlivých mutantních linií *pldd* (1-8) amplifikovanou v PCR reakci pomocí sady tří primerů. V jedné reakci (LP, RP primery) se sledovala přítomnost asi 1 200 bp velkého fragmentu pro část PLD δ a tento fragment byl amplifikován v heterozygotních liniích a rostlinách divokého typu. Ve druhé PCR reakci (RP, LBb1.3 primery) se amplifikovala část nefunkční PLD δ a část inzertu T-DNA z *A. tumefaciens* o velikosti 600-900 bp a tento fragment byl přítomen v homozygotních i heterozygotních rostlinách. U všech osmi *pldd* mutantních linií se objevila amplifikace PCR produktu pouze u sady primerů RP a LBb1.3, což znamená, že šlo o homozygoty.

Pětidenní rostlinky *A. thaliana* WT i *pldd* se přenesly na medium s přidaným NaCl (150 mM a nebo 200 mM koncentrace). Po 30 min, 2, 3 a 5 h působení solného stresu se rostliny fixovaly a protilátkou se označily mikrotubuly v kořenech. Od každé pokusné varianty bylo paralelně pozorováno nejméně pět kořenů konfokálním skenovacím mikroskopem a v každém kořeni počítány mikrotubuly nejméně v šesti kořenových buňkách ve dvou oblastech. První sledovaná oblast se nacházela 300-420 μ m, druhá pak 540-660 μ m od kořenové špičky. Počet mikrotubulů každé kořenové buňky byl měřen na 20 μ m délky buňky, vztažen na 1 μ m délky a tato hodnota označována jako densita mikrotubulů.

Hlavním sledovaným parametrem byla schopnost rekonstrukce mikrotubulární sítě během pěti hodin, kdy na rostliny působila sůl (Obr.35 a 36).



Obr. 35: Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (150mM NaCl) v kořenových buňkách pětidenních rostlin *A. thaliana* divokého typu (WT) v časech 30 minut, 2, 3 a 5 hodin od začátku působení NaCl. Semenáčky byly fixovány a značeny protilátkou proti α -tubulinu. Od každé pokusné varianty bylo pozorováno vždy šest buněk, paralelně v pěti kořenech konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss) ve dvou sledovaných oblastech. První se nacházela 300-420 μm , druhá pak 540-660 μm od kořenové špičky. Mikrofotografie znázorňují projekci 5 snímků z různých optických rovin. Měřítko odpovídá 10 μm .

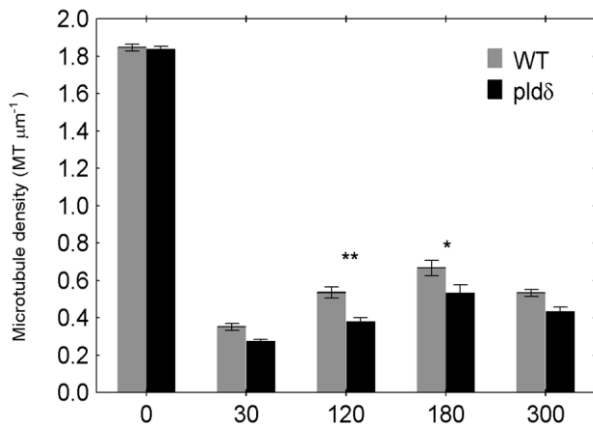


Obr. 36: Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (150mM NaCl) v kořenových buňkách pětidenních rostlin *A. thaliana* mutantní linie *pldδ* SALK 023247 v časech 30 minut, 2, 3 a 5 hodin od začátku působení NaCl. Semenáčky byly fixovány a značeny protilátkou proti α -tubulinu. Od každé pokusné varianty bylo pozorováno vždy šest buněk, paralelně v pěti kořenech konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss) ve dvou sledovaných oblastech. První se nacházela 300-420 μm , druhá pak 540-660 μm od kořenové špičky. Mikrofotografie znázorňují projekci 5 snímků z různých optických rovin. Měřítko odpovídá 10 μm .

Byly pozorovány statisticky významné rozdíly v uspořádání mikrotubulů u rostlin divokého typu a mutantu *pldδ* po působení 150 a 200 mM koncentrace NaCl. Mikrotubuly mutantu *pldδ*SALK_023247 vykazovaly horší adaptaci na solný stres a během jeho působení jejich počet regeneroval pomaleji než u rostlin divokého typu.

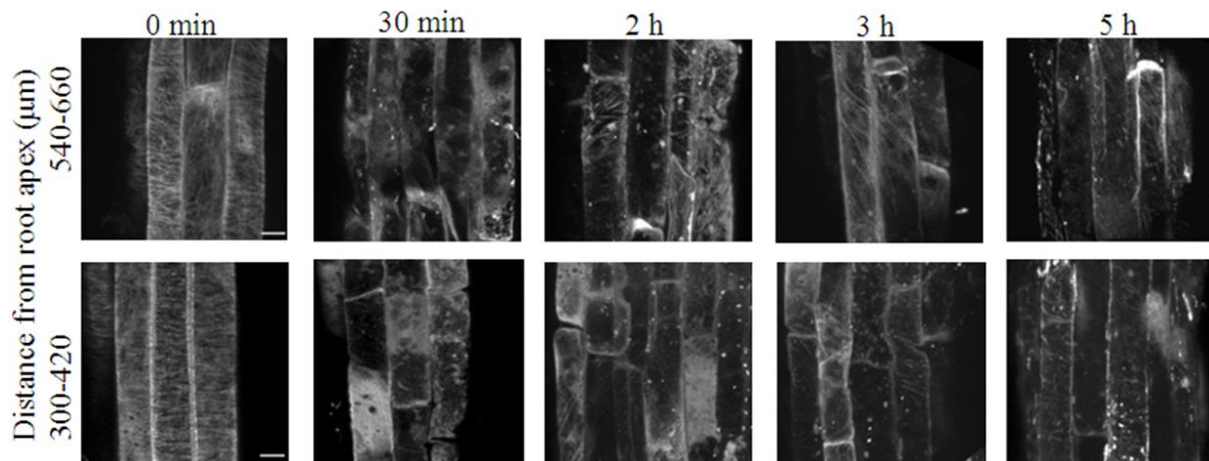
30min po působení 150 mM NaCl se snížila hustota mikrotubulů. Po dvou hodinách se cytoskelet začal adaptovat na zasolení a počet mikrotubulů stoupl, kolem třetí hodiny byla hustota mikrotubulů největší a kolem páté hodiny nastal určitý pokles. Statisticky významné

rozdíly oproti WT můžeme pozorovat po dvou (0,56 oproti 0,36 $\text{MT} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) a třech hodinách působení soli (0,74 oproti 0,65 $\text{MT} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). Odlišnost byla průkazná na hladině významnosti 1% po dvou hodinách a 5% po třech hodinách. (Obr. 37).

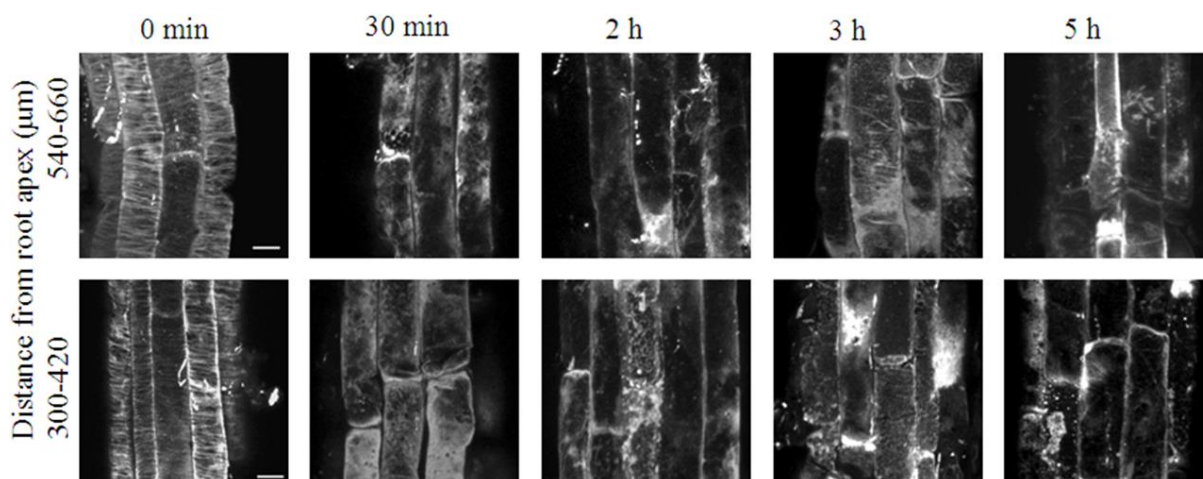


Obr. 37: Graf rekonstrukce počtu mikrotubulů po aplikaci solného stresu (150mM). Graf znázorňuje denzitu mikrotubulů v kořenech rostlin *A.thaliana* divokého typu a mutantu *pldδ* od začátku působení NaCl v čase (min). Hodnoty mikrotubulárních denzit byly získány kvantifikací imunoznačených mikrotubulů na 20 μm délky každé sledované buňky. Denzita mikrotubulů vyjadřuje jejich počet vztažený na 1 μm délky. Hvězdičky indikují statistickou významné rozdíly šedesáti měření mezi mutantními rostlinami a rostlinami divokého typu (WT, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, Studentův t test)

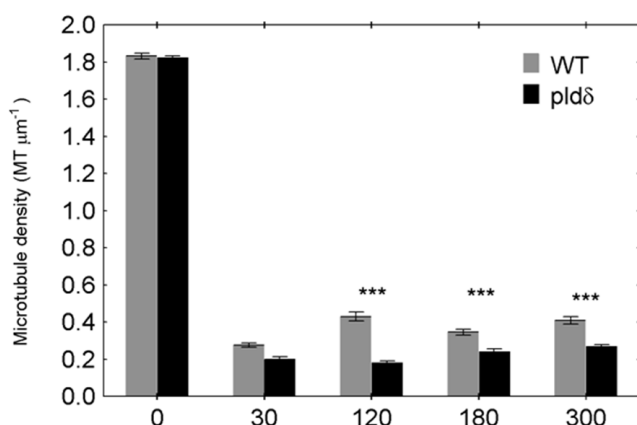
Vyšší koncentrace soli (200 mM) byla pro mutantní rostliny již natolik toxická, že se mikrotubuly skoro neregenerovaly a jejich hustota zůstávala po celou dobu experimentu prakticky na téže hodnotě (Obr. 38, 39). Po 2, 3 a 5 h se hodnoty density MT u WT významně statisticky odlišovaly od hustoty mikrotubulů u mutantu na hladině významnosti 0,1% u všech tří časů. (Obr. 40). Hodnoty hustoty MT pro jednotlivé varianty jsou shrnuty v tabulce (Tab. 6). Můžeme tedy říci, že obě koncentrace soli významněji poškozovaly mikrotubulární síť mutantu v porovnání s divokým typem. Mikrotubuly v mutantu *pldδ* nejsou schopny se na zasolení adaptovat tak rychle, jako to dokáží MT kořenů divokého typu rostlin.



Obr. 38: Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (200mM NaCl) v kořenových buňkách pětidenních rostlin *A. thaliana* divokého typu (WT) v časech 30 minut, 2, 3 a 5 hodin od začátku působení NaCl. Semenačky byly fixovány a značeny protilátkou proti α -tubulinu. Od každé pokusné varianty bylo pozorováno vždy šest buněk, paralelně v pěti kořenech konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss) ve dvou sledovaných oblastech. První se nacházela 300-420 μm , druhá pak 540-660 μm od kořenové špičky. Mikrofotografie znázorňují projekci 5 snímků z různých optických rovin. Měřítko odpovídá 10 μm .



Obr. 39: Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (200mM NaCl) v kořenových buňkách pětidenních rostlin *A. thaliana* mutantní linie *pldδ* SALK 023247 v časech 30 minut, 2, 3 a 5 hodin od začátku působení NaCl. Semenáčky byly fixovány a značeny protilátkou proti α -tubulinu. Od každé pokusné varianty bylo pozorováno vždy šest buněk, paralelně v pěti kořenech konfokálním skenovacím mikroskopem LSM 5 DUO (Zeiss) ve dvou sledovaných oblastech. První se nacházela 300-420 μm , druhá pak 540-660 μm od kořenové špičky. Mikrofotografie znázorňují projekci 5 snímků z různých optických rovin. Měřítko odpovídá 10 μm .

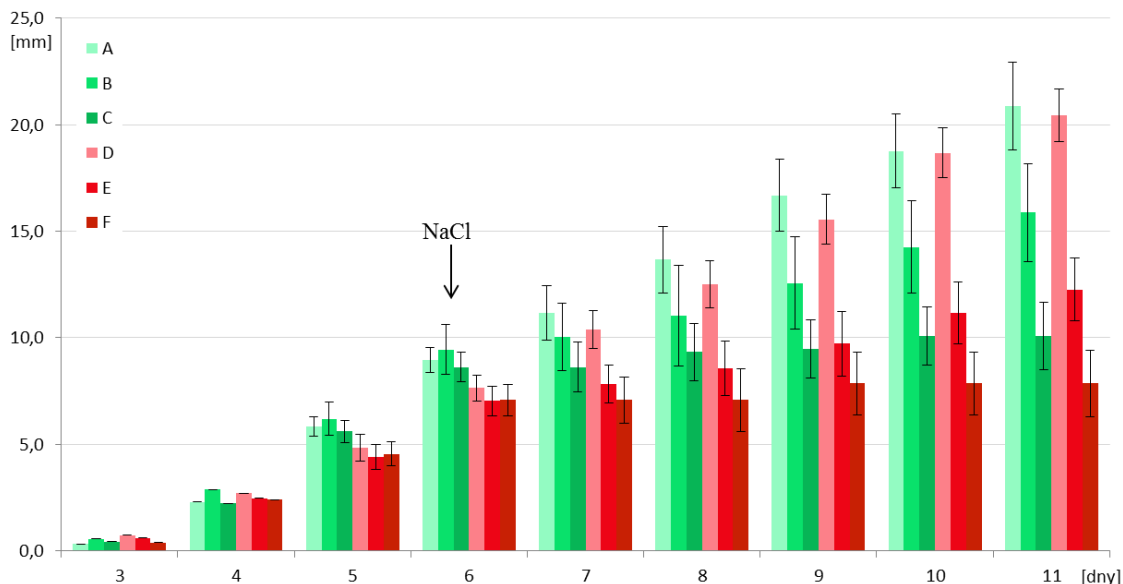


Obr. 40: Graf rekonstrukce počtu mikrotubulů po aplikaci solného stresu (200mM). Graf znázorňuje denzitu mikrotubulů v kořenech rostlin *A. thaliana* divokého typu a mutantu *pldδ* od začátku působení NaCl v čase (min). Hodnoty denzit MT byly získány kvantifikací imunoznačených mikrotubulů na 20 μm délky každé sledované buňky. Denzita mikrotubulů vyjadřuje jejich počet vztažený na 1 μm délky. Hvězdičky indikují statistickou významné rozdíly šedesáti měření mezi mutantními rostlinami a rostlinami divokého typu (WT, *** $P < 0,001$, Studentův t test)

150mM NaCl		200mM NaCl		čas
WT	<i>pldd</i>	WT	<i>pldd</i>	působení
1,85	1,85	1,83	1,81	0 min
0,35	0,27	0,25	0,17	30 min
0,56	0,36	0,43	0,15	120 min
0,74	0,65	0,38	0,25	180 min
0,54	0,39	0,44	0,26	300 min

Tab.6: Hodnoty denzit mikrotubulů po aplikaci solného stresu (150 a 200mM NaCl) v kořenech rostlin *A. thaliana* divokého typu (WT) a mutantu PLD δ . Počet mikrotubulů každé kořenové buňky byl měřen na 20 μm délky buňky, vztažen na 1 μm délky a tato hodnota označována jako denzita mikrotubulů. Každý údaj představuje průměrnou hodnotu z šedesáti měření.

Dalším sledovaným parametrem byl dlouhodobý vliv 150 a 200 mM koncentrace NaCl na růst kořenů *A. thaliana* WT a *pldδ*. Šestý den po vysetí semen na medium bez přídavku soli byla část rostlin obou variant přenesena na medium se solí, kde byly rostliny sledovány dalších pět dnů. Po celou dobu experimentu se každý den zaznamenávala délka kořenů, paralelně pro 15 semenáčků od každé varianty ve dvou biologických opakováních. Výsledky prokázaly zpomalený růst nebo jeho úplnou zástavu po působení obou koncentrací soli u *A. thaliana* WT oproti neošetřeným rostlinám, ale růst kořenů linie *A. thaliana pldδ* byl v přítomnosti obou koncentrací soli ještě pomalejší, než růst kořenů WT za stejných podmínek. (Obr. 41). Při vyšší koncentraci soli některé rostliny s vyřazenou funkcí PLDδ uhynuly. Snížení rychlosti nebo zástava růstu kořenů a uhynutí některých rostlin mutantní linie *pldδ* po působení solného stresu ukazuje na důležitost včasné regenerace mikrotubulárního cytoskeletu během adaptace rostlin na solný stres.



Obr. 41: Dlouhodobý vliv solného stresu na růst kořenů *A. thaliana* WT (A- C) a *pldδ* (D – F).

Po šesti dnech růstu byla část rostlin přesunuta na MS zpevněné medium se 150 mM (B, E) nebo 200 mM NaCl (C, F). Část rostlin byla ponechána na kontrolním MS médiu bez přídavku soli (A, D). Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku pro 30 měření (15 semenáčků a dvě biologická opakování).

Během aklimace rostlin na solný stres byly pozorovány změny v denzitě mikrotubulů. V souladu s naším pozorováním byl popsán úbytek mikrotubulárních vláken s následnou regenerací (Wang *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2011). Zdá se tedy, že úbytek mikrotubulů a jejich regenerace je důležitý krok při účinné obraně rostliny během solného stresu, ale tyto procesy musejí být správně načasovány. Když totiž byly mikrotubuly stabilizovány taxolem a poté byla aplikována sůl, zvýšila se úmrtnost rostlin. Počáteční depolymerizace mikrotubulů následovaná tvorbou úplně nové mikrotubulární sítě s jiným „úkolem“ je zřejmě nezbytnou podmínkou k tomu, aby reakce všech proteinů proběhly včas a na správném místě a vyústily

v účinnou obranu proti abiotickému stresu (Wang *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2012). Ze zpomalené reakce rostlin, kterým chyběla PDL δ , vyplývá, že tato isoforma hraje důležitou roli a nějakým způsobem napomáhá mikrotubulům v regeneraci. Mohla by to být právě jejich fixace pomocí PLD δ k plasmatické membráně, která napomůže k jejich polymeraci (Dixit *et al.*, 2004). Důležitost propojení PLD δ a MT vyplývá i z toho, že oba proteiny se zapojují během signalizace po různých zátěžových situacích – např. po bakteriální infekci (Kobayashi *et al.*, 1997), osmotickém stresu, zranění a po působení hormonů (Dhonukshe *et al.*, 2003 a), které může nastat v průběhu signalizačních dějů spuštěných právě zmíněnými stresovými faktory.

PLD se však může na zlepšení regenerace MT podílet i nepřímo, přes proteiny asociované s mikrotubuly (MAP), podobně, jako je tomu u aktinového cytoskeletu a ABP. Opravdu byl nalezen protein MAP65-1, který zvyšuje svazkování a polymeraci mikrotubulů po působení PA. S kortikálními mikrotubuly je asociováno více MAP65: MAP65-1, 2, 5 a 8, ale pouze MAP65-1 zlepšuje kondici mikrotubulů při solném stresu a je zapojen v adaptaci rostlin na solný stres (Zhang *et al.*, 2012). Když byly v molekule MAP65-1 mutovány aminokyseliny podílející se na vazbě PA, MAP65-1 přestal mít schopnost se vázat k mikrotubulům a u rostlin vystavených solnému stresu se zvýšila incidence hypersenzitivní reakce. Hypersenzitivní reakce je do určitého rozsahu prospěšná, protože v okolním pletivu může iniciovat další obranné mechanismy, překročí-li však její rozsah určitou prahovou hodnotu, nastávají nezvratné změny a smrt organismu. Je možné, že právě nedostatečná rychlost regenerace mikrotubulů v mutantní linii *pld δ* vedla u některých rostlin k přehnané hypersenzitivní reakci a uhynutí. Hypersenzitivní reakce se objevuje u stresu ze zasolení při vyšších koncentracích soli, ale zajímavé je, že u mutantů s porušenou funkcí MAP65-1 se vyskytuje méně při stejné koncentraci soli, z toho vyplývá, že k rozvoji HR u rostlin je zapotřebí MAP65-1 a rozvoj HR postupuje přes navázání PA a ovlivnění mikrotubulů (Zhang *et al.*, 2012). Nepřítomnost MAP65-1 tedy hypersenzitivní reakci snižuje, ale PLD δ a přiměřená hustota mikrotubulární sítě může působit jiným, regulačním mechanismem a udržovat rozsah hypersenzitivní reakce v její signalizační fázi (Higaki *et al.*, 2011).

Zhang, v citovaném článku, spojuje produkci PA s funkcí PLD α 1, která je ze všech izoform PLD v rostlinách nejhojněji zastoupena. V mutantu *pld α 1* se oproti WT snížil počet MT po 6 h působení 50mM NaCl. Správná funkce PLD α 1 je tedy nezbytná pro tvorbu PA a následné ovlivnění MAP65-1, který ve správnou chvíli způsobí polymeraci a stabilizaci mikrotubulů a pomůže rostlinným buňkám vyrovnat se s působením solného stresu, přímá vazba PLD α 1 na mikrotubuly však prokázána nebyla.

Katagiri popisuje, že násobný mutant *pld δ* a *α 1* byl k soli citlivější než mutanty samotné (Katagiri *et al.*, 2001), což by sice mohlo být způsobeno větším snížením produkce PA u mutantů násobného než u mutantů jednoduchých, ale mohlo by to být dáno i jiným mechanismem, kterým by mohla PLD δ při působení solného stresu stabilizovat mikrotubuly. Blokováním funkce PA pomocí n-butanolu, bylo pozorováno odpojování mikrotubulů od plasmatické membrány, což bylo spojováno s funkcí PLD δ (Dhonukshe *et al.*, 2003 a).

U PLD δ se předpokládá přímá vazba nebo vazba přes další proteiny k MT, v kapitole 5.2.3. byla lokalizace PLD δ kopírující dráhy MT také dokázána. Stabilizace MT vazbou k plasmatické membráně přes můstek tvořený samotnou PLD δ (Gardiner *et al.*, 2001) nebo ještě jinými proteiny zapojenými do tohoto komplexu by mohl být dalším mechanismem

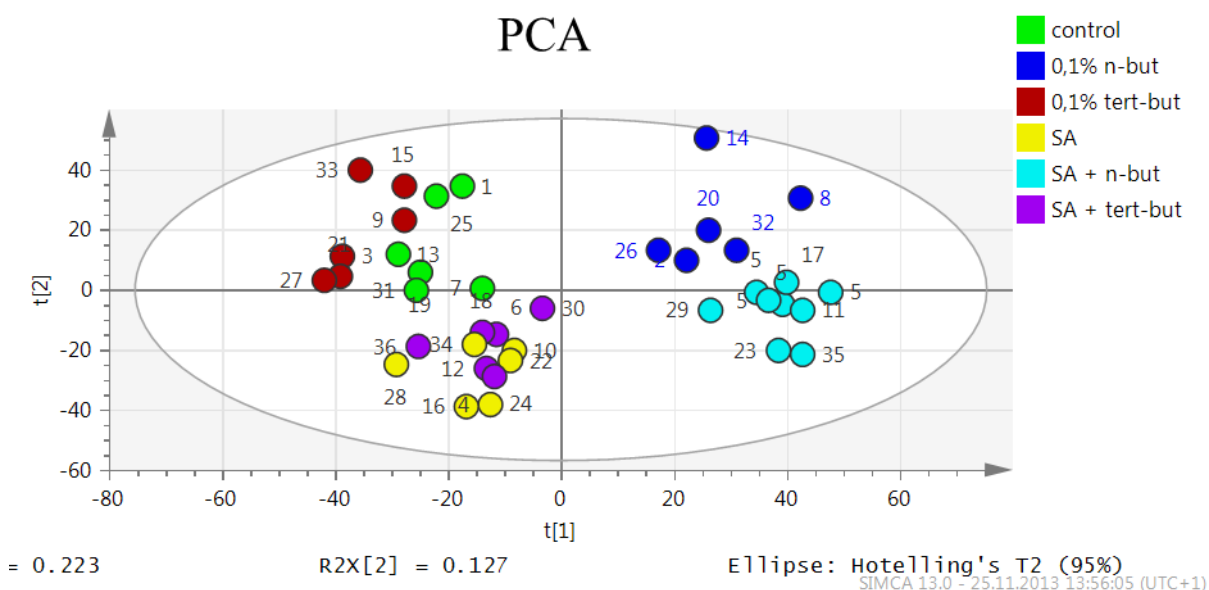
napomáhajícím stabilizaci MT během adaptační reakce na solný stres, stejně jako na ostatní typy stresových signálů, kde je k adaptaci nutná stabilizace mikrotubulů.

5.4. Ovlivnění metabolomu *Arabidopsis thaliana* signálními molekulami

Tvorba sekundárních metabolitů během obranných reakcí rostlin probíhá v pozdní fázi celé reakce. Během stresové signalizace se metabolismus přeměrovává k obranným reakcím a nově nebo více se exprimují proteiny, které potom modifikují nízkomolekulární látky, sledované v rámci změn v metabolomu rostliny po působení signálních molekul účastnících se obranné reakce.

Sledováním profilu nízkomolekulárních látek z extraktu rostlin *A.thaliana* WT a *eds1* mutantu bez ošetření a *Ath* WT po ošetření signální molekulou SA a blokováním účinku PA použitím n-butanolu, jsme chtěli zjistit dopad změn v signalizaci na výskyt sekundárních metabolitů.

Metabolomickou analýzou extraktů *A. thaliana* bez ošetření nebo 6 h po ošetření 0,1% n-butanolem, 50 μ M SA, 0,1% n-but s SA nebo kontrolním neaktivním analogem 0,1% tert-butanolem a kombinací 50 μ M SA s 0,1% t-butanolem bylo nalezeno 219 látek (tzv. markerů) definovaných pomocí molekulární hmotnosti, retenčního času a intenzity signálu (ta odpovídá ploše píku získaného analýzou). Pomocí PCA analýzy (principle component analysis) byly vzorky rozděleny na základě podobnosti jejich metabolomických profilů, tedy intenzit jednotlivých markerů (Obr. 42). Jestliže se body představující jednotlivé vzorky po určitém ošetření spojí v grafu do oddělené skupiny, znamená to, že dané ošetření změnilo relativní množství daných látek oproti jiným ošetřením nebo oproti kontrole. Jestliže se v grafu mísí body reprezentující jednotlivé vzorky po různých ošetřeních znamená to, že se množství látek po těchto ošetřeních neliší. V grafu PCA můžeme vidět velmi dobře oddělené dvě skupiny vzorků: v pravé části grafu se nachází vzorky po ošetření n-butanolem a směsí n-butanolu s SA, zatímco v levé části grafu jsou umístěny vzorky neošetřené n-butanolem (kontrolní, tert-butanol, SA a SA+tert-butanol). Z jiného pohledu také vyplývá, že vzorky umístěné v PCA diagramu nahoře byly ošetřeny SA, naopak vzorky v dolní části nikoliv.

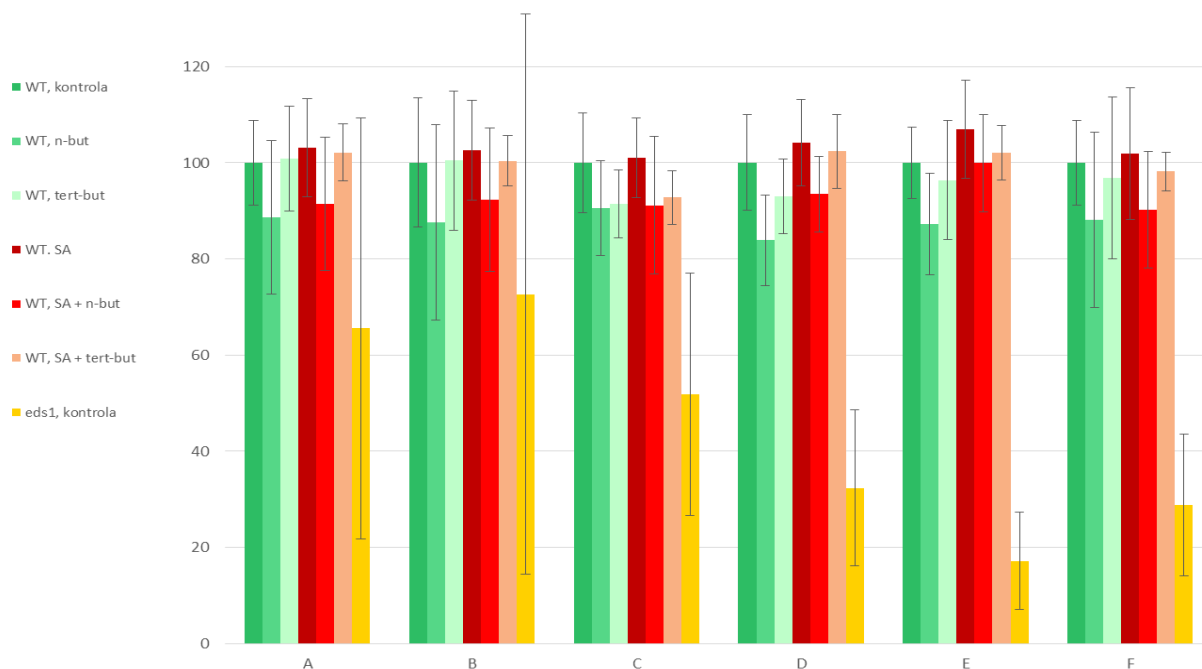


Obr. 42: Analýza hlavních komponent (PCA) markerů analyzovaných metodou UHPLC–QTOFMS. Extrakty *A. thaliana* WT byly analyzovány ve variantách bez ošetření nebo po ošetření signální molekulou SA, blokováním účinku PA použitím n-butanolu, případně inaktivním analogem tert-butanolem a jejich kombinacemi. Jednotlivé varianty jsou kódovány barevně, jak je uvedeno v legendě.

Znamená to tedy, že ošetření n-butanolem (ať už s SA nebo bez ní) výrazněji pozměnilo množství nalezených látek oproti kontrole nebo dalším ošetřením. Můžeme říci i to, že se liší vzorky neošetřené (nebo ošetřené neaktivním analogem) a vzorky po působení SA (popř. spolu s neaktivním analogem t-butanolem).

V této fázi pokusu jsme věděli, že relativní množství látek se významněji mění po eliminaci vlivu PA a méně se mění po přidání samotné SA, avšak blokování PA n-butanolem s přidanou SA mělo podobný efekt jako blokování samotnou PA a způsobuje tedy konzistentní metabolickou odpověď.

Neznali jsme konkrétní ovlivněné látky, ale pouze molekulární hmotnosti nalezených látek v rozmezí $M_r = 50-1\ 000$. Z databáze primárních a sekundárních metabolitů *A. thaliana* (KNApSAcK: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database, online) byly vybrány sekundární metabolity (případně jejich prekurzory a některé látky se signální funkcí), které molekulovou hmotností odpovídaly danému rozmezí a mohly by se účastnit obranných reakcí, ve kterých je zapojena fosfolipidová signální dráha nebo dráha SA (Příloha 3). Porovnáním molekulových hmotností vytipovaných metabolitů s molekulovými hmotnostmi látek nalezených hmotnostní spektrometrií, jsme identifikovali šest látek, jejichž relativní množství se po ošetření měnilo. V zásadě jde o fenylypropanoid – kyselinu sinapovou a její deriváty a flavonol kempferol a jeho glykosylované deriváty. U všech šesti látek byl po ošetření pozorován podobný trend. Relativní množství nalezených látek bez ošetření bylo stanoveno jako 100%; k nejvýraznějšímu poklesu (který však je statisticky významný pouze u kempferol rhamnosidu po ošetření n-but na hladině významnosti do 5%) došlo po 6 h působení n-butanolu, mírnější pokles nastal po působení n-butanolu a SA zároveň. Naopak velmi nepatrné zvýšení množství sledovaných látek nastalo po 6 h působení SA (který však je statisticky významný pouze u kempferol rhamnosidu po ošetření SA na hladině významnosti do 1%). Použití ostatních ošetření nevykazovalo žádný souvislý trend. Významně klesal obsah derivátů kempferolu v *eds1* mutantní linii oproti rostlinám divokého typu bez ošetření. (Obr. 43).



Obr. 43: Graf porovnání relativního množství vybraných sekundárních metabolitů v rostlinách *A. thaliana*, WT po ošetření signálními látkami a jejich kombinací, jak je uvedeno v legendě. Sledované obsahové metabolity jsou (A) kyselina sinapová (B) sinapoyl malát, (C) glukosid kyseliny sinapové, (D) dirhamnosid kempferolu, (E) glukosid-rhamnosid kempferolu, (F) glukosid-dirhamnosid kempferolu byly sledovány i u mutantní linie *eds1* bez ošetření metodou UHPLC-QTOFMS. Relativní množství metabolitu pro každé ošetření je vyjádřeno procenty vzhledem k obsahu sledované látky v rostlinách divokého typu bez ošetření (WT, kontrola).

Spuštění signální dráhy, ve které je zapojena SA je diskutováno hlavně v souvislosti s obranou proti biotrofním patogenům, ale i další biotické vlivy vyvolávají signalizaci, kde je SA zapojena například v interakci SA a JA signální dráhy (Dempsey *et al.*, 2011, Loake *et al.*, 2007). Podílí se i při signalizaci, která se spouští po abiotických stresech – při suchu, nefyziologických teplotách, zvýšené koncentraci soli, UV záření, oxidačním stresu ap. (Miura *et al.*, 2014). Podobně i PA je zapojena skrze zvýšení aktivity PLD i PLC ve fosfolipidové signalizaci a aktivuje se, jak při biotickém, tak i abiotickém stresu (Bargmann *et al.*, 2009 a, Bargmann *et al.*, 2009 b, Bargmann *et al.*, 2006).

Biosyntéza fenylypropanoidů je součástí velké šikimátové biosyntetické dráhy, která se větví a směřuje k biosyntéze velkého množství sekundárních metabolitů v rostlinách: flavonoidů, taninů, kumarinů. Fenylypropanoidová dráha produkuje i signální molekuly, jako je SA, metylsalicylát, hormonální látky (auxiny). Její meziprodukty, kyselina ferulová, kávová, sinapová a další mohou vyústit v syntézu ligninu. Klíčovým enzymem této dráhy je fenylyalaninamoniaklyasa (PAL) deaminující fenylyalanin na kyselinu *trans*-skořicovou, zde se dráha větví směrem k fenylypropanoidům nebo kumarinům (Dixon *et al.*, 2002, Vogt 2010). Námi identifikované deriváty kyseliny sinapové a kempferolu jsou tedy hojně se vyskytující sekundární metabolity, jejichž biosyntéza bude ovlivňovaná většinou signálních molekul objevujících se během signalizace vedoucí k obranným reakcím. Ačkoliv je tato biosyntetická dráha velmi důležitá, je zajímavé, že ještě není zmapováno mnoho enzymů zapojených

v biosyntéze konkrétně u sinapové kyseliny nebo kempferolu a jejich derivátů (Nair *et al.*, 2004, Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2007). Ovlivnění biosyntézy těchto látek běžně studovanými signálními molekulami, jakými jsou SA nebo PA, můžeme tedy odvodit pouze podle nepřímých důkazů. Během metabolické studie jsme zjistili, že *eds1* mutant má oproti WT velmi snížen obsah derivátů kempferolu naproti tomu blokování PA signalizace snížilo její obsah jen nepatrně. EDS1 je lipasám podobný protein, který se spojuje s RPS4, receptorem pro efektorové bakteriální molekuly a tento komplex zřejmě v jádře ovlivňuje expresi genů zapojených v obraně. Produkty tohoto procesu nakonec blokují růst bakterií (Heidrich *et al.*, 2011). Je tedy zřejmé, že EDS1 protein působí spíše na počátku, po percepci efektorových molekul a pokud chybí, má to na rostlinu velmi komplexní dopad. Naproti tomu se blokováním PA signalizace nebo přidáním SA profily sekundárních metabolitů změnily jen mírně, protože tyto dvě dráhy se vyskytují během obranné reakce až později a jsou jen součástí složité signalizační sítě, kde výpadek jedné složky nemusí mít tak výrazné dopady na výslednou obranu (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011 a).

Trend, který nám odhalila PCA analýza i vyhodnocení konkrétních sekundárních metabolitů ukazuje, že blokování PA ovlivňuje metabolom podobně, ať už byly rostliny ošetřeny n-butanolem samotným, nebo ve směsi s SA, množství sledovaných látek oproti kontrole mírně klesá. Po SA samotné naopak graf u sledovaných látek ukazuje mírný vzestup oproti kontrole. Podobný trend byl pozorován u exprese genů pro obranné PR-1 proteiny v suspenzních kulturách *A. thaliana*, kdy SA zvyšuje jejich expresi oproti kontrole, ale n-butanol sám nebo společně s SA jejich expresi snižuje (Krinke *et al.*, 2009). Tento fenomén by mohl souviset i se signalizací, do které je zapojen aktinový cytoskelet. Rozpad cytoskeletu, stejně jako SA zvyšuje expresi genů *PR1*. Rozpad cytoskeletu by mohl být důležitý signál, který má své místo ve správně probíhající obranné reakci vedoucí až k produkci sekundárních metabolitů. Předpokládá se totiž, že jak depolymerovaná vlákna cytoskeletu tak i SA vedou k aktivaci PLD a vzniku PA, která spouští nejen regeneraci cytoskeletu, ale je zapojena i v mnoha dalších signalizačních událostech. (Kalachova *et al.*, 2013, Matouskova *et al.*, 2014). Když je ale PA nahrazena nefunkčním fosfatidylbutanolem po ošetření n-butanolem, mnoho signálních reakcí, které probíhají po PA nenastane, a tím nepokračuje signalizace ve správném sledu a nevede k přiměřené obraně, kam patří i produkce sekundárních metabolitů. Je tedy jisté, že jsme teprve na samém počátku poznání mechanismů, které vedou k odhalení průběhu signalizace a jejího dopadu na produkci sekundárních metabolitů během obranné reakce.

6. Závěr

Cílem této práce bylo prostudovat úlohu cytoskeletu a fosfolipidové signalizace při obranných reakcích rostlin.

S využitím fluorescenčně značených proteinů v živých pletivech rostlin se pomocí konfokální mikroskopie podařilo vizualizovat úbývání vláken aktinového cytoskeletu během signalizace kyselinou salicylovou (SA). Vzestup hladiny SA a následný rozpad aktinového cytoskeletu měly za následek růst exprese obranných markerových genů PR-1. Avšak zvýšení aktivity fosfolipasy D nasimulované přidáním kyseliny fosfatidové (PA) před SA revertovalo účinek SA na aktinovou síť, a ta začala polymerovat. Z literárních pramenů bylo zjištěno, že fáze polymerace aktinového cytoskeletu nastává při patogenem spuštěné obranné reakci před zvýšením hladiny SA a také delší dobu po něm, ale bezprostředně (do 1 h) po zvýšení hladiny SA cytoskeletální vlákna mizejí. To nás vedlo k předpokladu, že správně načasované střídání rozpadu a polymerace cytoskeltu má vliv na úspěšný průběh obranné reakce.

Vizualizací fúzních fluorescenčních proteinů v rostlinách a suspenzních kulturách transformovaných stabilně nebo transientně markery pro fosfolipasu D δ (PLD δ) a/nebo mikrotubuly se podařilo odhalit *in vivo* lokalizaci PLD δ na plasmatické membráně buněk. PLD δ tvoří velmi dynamické body nebo vzácnější, stabilní filamenta v blízkosti plasmatické membrány, která mohou kolokalizovat s dráhou kortikálních mikrotubulů přímo nebo vazbou přes další proteiny. Je pravděpodobné, že PLD δ se vyskytuje v oblasti lipidových raftů, které jsou známé svou signalizační aktivitou steně jako PLD δ .

Důležitost propojení PLD δ s mikrotubuly při reakci na solný stres byla potvrzena lepší regenerací mikrotubulů a adaptací rostlin. Rostliny s vyřazenou funkcí PLD δ nebyly schopné regenerovat mikrotubulární síť tak dobře, jako rostliny, kde byla PLD δ přítomna, to se projevilo m.j. zpomalením nebo zastavením růstu kořenů. Předpokládá se, že PLD δ napomáhá regeneraci mikrotubulů při solném stresu, buď přes účinek PA, vznikající její aktivitou nebo přímou stabilizací – vazbou mikrotubulů k plasmatické membráně.

Tvorba sekundárních metabolitů je součástí obrany při mnoha stresových reakcích rostlin. Analýza hmotnostní spektrometrií prokázala sníženou tvorbu derivátů kempferolu a sinapové kyseliny po zablokování účinku PA stejně jako po vyřazení funkce proteinu EDS, který se podílí na přenosu signálu po percepci efektorových molekul patogenu. Výsledky potvrdily, že i tvorba sekundárních metabolitů je závislá na signalizačních dějích probíhajících během obrany ve správném pořadí.

7. Použité zkratky

ABA	abscisová kyselina (abscisic acid)
ABC	ATP-binding cassette transporter (transportér xenobiotických látek)
ABP	actin binding protein
ABRE	ABA-responsive element
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ACT (1-11)	proteiny rodiny aktinu (actin-family proteins 1-11)
ADF	actin depolymerization factor
ADF4	actin depolymerization factor 4
AF	aktinový filament (actin filament)
AOS	allene oxide synthase
AREB	ABRE-binding
ARF	auxin response factor
ARP 2/3	actin related protein 2/3 complex
ATG5	autophagy related 5
ATK5	kinesin 5
ATP	adenosintrifosfát (adenosin triphosphate)
Aux/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID responsive
AuxREs	auxin response elements
Avr	avirulence protein
AvrPphB	cysteine protease avirulence protein AvrPphB
BAK1/SERK3	BRI1-associated receptor kinase1/ somatic embryogenesis receptor kinase3
BPDS	Biolistic Particle Delivery System
BR	brassinosteroidy (brassinosteroids)
BRI1	brassinosteroid insensitive1
BTH	benzothiadiazol
BY-2	suspenzní kultura buněk <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2
CC doména	coiling coil doména
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie (confocal laser scanning microscopy)
COI1	coronatine insensitive 1
CP	čepičkující protein (capping protein)
CUL3	cullin-3
CytE	cytochalasin E
DAG	diacylglycerol
DAMP	damage associated molecular pattern
DIC	diferenciální interferenční kontrast (differential interference contrast microscopy)
DIM	detergent-insoluble membranes
DIR1	defective in induced resistance
DMSO	dimethylsulfoxid (dimethyl sulfoxide)

DREB	dehydration-responsive element binding protein
DRM	detergent-resistant membrane
EDS1	enhanced disease susceptibility 1 (lipázám podobný protein)
EDS5	enhanced disease susceptibility 5 (synonymum SID1 - Salicylic acid induction-deficient 1)
EDS16	enhanced disease susceptibility 16 (synonymum ICS1 - isochorismát syntáza a SID2 - Salicylic acid induction-deficient 2)
EIGT	glucosyltransferase
ER	endoplasmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
ERF1	ethylen response factor 1
ET	etylen (ethylen)
ETI	efektorem spuštěná obranná reakce (effector triggered immunity)
fABD2	fimbrin Actin Binding Domain 2
FITC	fluorescenční barvivo – fluorescein isothiokyanát (fluorescein isothiocyanate)
flg22	flagelin
FLS2	flagellin-sensitive 2
FM4-64	fluorescenční barvivo - {N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-[6-(4-(diethylamino) fenyl) hexatrienyl]pyridinium dibromide}
GA	gibberelic acid (gibereliny)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GPI	glykosylfosfatidylinositolová kotva (Glycophosphatidylinositol)
GST6	glutathion-S-transferase
GTP	guanosintrifosfát (guanosine triphosphate)
HBA	4-hydroxybenzoová kyselina (4-hydroxybenzoic acid)
HopG1	efektorová molekula z <i>Pseudomonas syringae</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
HR-PCD	hypersenzitivní reakce – programovaná buněčná smrt
HSP	heat shock protein
ICS1	isochorismát syntáza 1 (synonyma SID2 a EDS16)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonát
IAA	kyselina indolactová (Indole-3-acetic acid; nativní auxin)
IPT	isopentenyltransferasu
IP3	inositoltrisfosfát (inositol triphosphate)
JA	jasmonic acid
JAI1	jasmonate insensitive 1 (synonymum MYC2)
JAZ	jasmonate ZIM-domain
JIN1	jasmonate insensitive 1 (synonymum MYC2)
KAT1	K ⁺ -inward rectifying channel, draselný vtokový kanál
LatB	latrunculin B
LC/MS	Liquid chromatography – mass spectrometry
LOX2	lipoxygenase 2

LPS	lipopolysacharidy
LRR	leucin-rich repeat domain
LRR-RLK	LRR receptor-like kinase
LTPs	lipid-transfer proteins
MAMP	microorganism-associated molecular pattern
MAP	proteiny asociované s mikrotubuly (microtubule-associated proteins)
MAP 4	microtubule-associated protein 4 (humánní)
MAP 65 (1,3,5)	microtubule-associated protein 65 family (členové genové rodiny 1, 3 a 5)
MAP 200	microtubule-associated protein 200 (synonymum MOR1, microtubule organization 1)
MAPK (3,4,6)	mitogen activated protein kinase (členové genové rodiny 3, 4 a 6)
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase
MATE	multidrug and toxin extrusion
MBD	microtubule binding domain z humánního MAP4
MeJA	methyljasmonát (methyl jasmonate)
mCh-	mCherry – červený fluorescenční protein získaný z <i>Discosoma sp.</i>
MOR1	microtubule organization 1
MS médium	médium podle Murashigeho a Skooga
MT	mikrotubuly (microtubules)
MTOC	microtubule-organizing center
MYB (28, 29, 30, 51, 76)	transkripční faktory z rodiny MYB
MYC2	transkripční factor MYC2 (synonymum JAI1 a ZBF1)
NAD(P)H	nicotinamidadeninukleotid(fosfát)
NAE	N-acylethanolamin (N-Acylethanolamine)
NAPE	N-acylfosfatidylethanolamin (N-Acylphosphatidylethanolamine)
NBS	nucleotide-binding site
NDR1	non-race-specific disease resistance 1
NHX1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger
NIM1	noninducible imunity 1
NIMIN1	NIM1 interacting 1
NPC	nespecifické PLC (nonspecific PLC)
NPR1	nonexpressor of PR genes 1
NPR3	nonexpressor of PR genes 3
NPR4	nonexpressor of PR genes 4
NSCC	non-selective cation channels
PA	kyselina fosfatidová (Phosphatidic acid)
PAD3	phytoalexin deficient 3 (cytochrom P450)
PAD4	phytoalexin deficient 4
PAL	fenylalaninamoniaklyasa (phenylalanine ammonia lyase)
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS1	avrPphB susceptible 1
PC	fosfatidylcholin (phosphatidylcholine)

PCA	analýza hlavních komponent (principle component analysis)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PE	fosfatidylethanolamin (phosphatidylethanolamine)
PEN1	penetration 1, člen rodiny syntaxinů
PFD3	prefoldin 3
PFD5	prefoldin 5
PG	fosfatidylglycerol (phosphatidylglycerol)
PI	fosfatidylinositol (phosphatidylinositol)
PI-PLC	fosfatidylinositol-PLC (phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C)
PIN2	Pin-formed 2 (exportní protein pro auxin)
PIP2	fosfatidylinositol 4,5- bisfosfát
PIP2;1	plasma membrane intrinsic protein 2A (akvaporin)
PLA	fosfolipáza A (phospholipase A)
PLC	fosfolipáza C (phospholipase C)
PLD α	fosfolipáza D α (phospholipase D α)
PLD β	fosfolipáza D β (phospholipase D β)
PLD γ	fosfolipáza D γ (phospholipase D γ)
PLD δ	fosfolipáza D δ (phospholipase D δ)
PLD ζ	fosfolipáza D ζ (phospholipase D ζ)
PM	plazmatická membrána (Plasmatic membrane)
PP2C	phosphatase 2C
PR1 (PR-1)	pathogen related 1 protein (gen)
PR2 (PR-2)	pathogen related 2 protein (gen)
PRRs	pattern recognition receptors
PS	fosfatidylserin (phosphatidylserin)
PTI	patogenem spuštěná obranná reakce (pathogen triggered immunity)
PYK10/BGLU23	beta-glucosidase 23
QTOFMS	quadrupole-time-of-flight mass spectrometry
RFP	červený fluorescenční protein (Red fluorescent protein)
RIN4	RPM1-interacting protein 4
RIPK	RPM1-induced protein kinase
RLK	receptor-like kinases
RLP	receptor-like proteins
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROP GTPasy	GTPázy Rho of plant (Rho of plant GTPases)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RPM1	resistance to Pseudomonas syringae pv 1
RPS5	resistant to Pseudomonas syringae 5
SA	kyselina salicylová (Salicylic acid)
SABP2	SA-binding protein
SAG101	senescence-associated protein 101
SAR	systemic acquired resistance
SDCM	Spinning disk confocal microscope
SDS	sodium dodecyl sulfate

SCF complex	Skp1/Cullin/F-box complex
SID1	SA-induction deficient (synonymum EDS5 - enhanced disease susceptibility 5)
SID2	SA-induction deficient 2 (synonymum ICS1 – isochorismát syntáza 1)
SIM	structured illumination microscopy
SIZ1	E3 SUMO ligase
SLAC1	slow anion channel associated 1
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SNI1	supressor of NPR1
SnRK2	SNF 1(sucrose non fermenting 1)-related protein kinase 2
SOS1	salinity overly sensitive 1 (Na ⁺ /H ⁺ antiporter)
SPR1	spiral 1, (člen TOR/SPIRAL proteinové rodiny)
SPR2/TOR1	spiral2, Microtubule-associated protein TORTIFOLIA1
T-DNA	Transfer DNA
T3SS	typ III secretion system
TIR	toll/interleukin-1-rezistence
TIR1	transport inhibitor response 1
TIR-NBS-LRR	R proteiny – toll/interleukin-1-rezistence, nucleotide binding site, leucin rich repeat (TNL)
TIRF	total internal reflection fluorescence microscopy
TLR4	toll-like receptor 4
TUA1	tubulin alpha-1 chain
TUA2	tubulin alpha-2 chain
TUA6	tubulin alpha-6 chain
TUB (2,3,4,8,9)	tubulin beta chain (2,3,4,8,9)
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatograph
VSP2	vegetative storage protein 2
WRKY (18, 33, 38, 40, 53, 60, 62, 70)	‘worky’ transcription factors (transkripční faktory rodiny WRKY)
ZBF1	Z-Box binding transcription factor 1 (synonymum MYC2)

8. Seznam tabulek

Tabulka 1	Přehled specifických ,povrchových antigenních stuktur rostlinných patogenů.....	8
Tabulka 2	Srovnání biochemických požadavků jednotlivých izoform PLD.	19
Tabulka 3	Podmínky separace extraktů <i>A.thaliana</i> pomocí UHPLC.	56
Tabulka 4	Podmínky analýzy extraktů <i>A. thaliana</i> pomocí techniky UHPLC- QTOFMS	57
Tabulka 5	Tabulka rozložení délek aktinových filament.....	60
Tabulka 6	Hodnoty denzit mikrotubulů po aplikaci solného stresu (150 a 200mM NaCl)	86

9. Seznam obrázků

Obrázek 1	Model dvoustupňové regulace systémově získané rezistence.	11
Obrázek 2	Schéma mechanismu signalizace salicylové kyseliny.	14
Obrázek 3	Schema míst, kde jednotlivé fosfolipasy štěpí fosfolipidy.	19
Obrázek 4	Model předpokládané degradace chloroplastu.	22
Obrázek 5	Zvláštní uspořádání MAP proteinu.	27
Obrázek 6	Reakce mikrotubulů na mechanickou stimulaci.	28
Obrázek 7.	Vliv cytoskeletárních drog na expresi markerových genů SA a JA.	30
Obrázek 8	Srovnání použití různých mikroskopických přístupů.	33
Obrázek 9	Přehled a předpokládaná funkce hlavních skupin sekundárních metabolitů u <i>A. thaliana</i>	35
Obrázek 10	Příklady sekundárních metabolitů přítomných v <i>A. thaliana</i>	36
Obrázek 11	Schematické znázornění zapojení některých miRNA.	38
Obrázek 12	Porovnání změn dynamiky aktinových filamentů u <i>Arabidopsis thaliana</i> po ošetření SA a cytoskeletálními drogami.	59
Obrázek 13	Změny dynamiky aktinových filamentů u <i>Arabidopsis thaliana</i> po ošetření SA a BTH.	61
Obrázek 14	Kvantitativní vyhodnocení analýzy obrazu.	62
Obrázek 15	Kyselina salicylová ovlivňuje cytoplasmatické proudění v buňkách.	63
Obrázek 16	Změny dynamiky aktinu u <i>Arabidopsis thaliana</i> po ošetření PA a PA následovaným SA.	66
Obrázek 17	Transientní exprese konstruktů GFP-PLDδ 20-24 h po biolistické transformaci v BY-2.	68
Obrázek 18	Expresce konstruktů GFP-PLDδ v buněčných suspenzních kulturách <i>A. thaliana</i>	69
Obrázek 19	Oryzalinem způsobený rozpad vláknitých struktur tvořených GFP-PLDδ v BY-2.	70
Obrázek 20	BY-2 buňky biolisticky transformované současně konstruktem pro GFP-PLDδ a RFP-MBD.	70
Obrázek 21	Cytosolický signál mikrotubulárního markeru mCh-TUB6.	71
Obrázek 22	Kortikální vrstva pokožkových buněk <i>A. thaliana</i> stabilně exprimující konstrukty GFP-fABD a/nebo mCh-TUA5.	72
Obrázek 23	Expresce konstruktů GFP-TUA6 v buněčných suspenzních kulturách <i>A. thaliana</i>	73
Obrázek 24	Lokalizace PLDδ v rostlinách <i>A. thaliana</i>	75
Obrázek 25	Bodová lokalizace PLDδ v rostlinách <i>A. thaliana</i>	76
Obrázek 26	Atypická lokalizace PLDδ v rostlinách <i>A. thaliana</i>	76
Obrázek 27	Vláknité struktury PLDδ v pokožkových buňkách listu <i>A. thaliana</i>	77
Obrázek 28	Vláknitá lokalizace PLDδ v pokožkových buňkách listu <i>A. thaliana</i>	78
Obrázek 29	Kolokalizace vláknitých struktur GFP-PLDδ s fluorescenčním barvivem FM4-64.	78
Obrázek 30	Kolokalizace vláknitých struktur biolisticky vneseného GFP-PLDδ a stabilně exprimovaného mikrotubulového markeru mCh-TUA5.	79
Obrázek 31	Kolokalizace vláknitých struktur stabilně exprimovaného GFP-PLDδ a biolisticky vneseného mikrotubulového markeru mCh-TUA5.	80
Obrázek 32	Trubicové vchlípení plasmatické membrány u kvasinky. . 8Error! Bookmark not defined.	
Obrázek 33	Uspořádání draselných vtokových kanálů KAT1.	82
Obrázek 34	Genotypizace mutantních linií <i>Arabidopsis thaliana</i> pldδ SALK 023247.	83
Obrázek 35	Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (150mM NaCl; WT).	84
Obrázek 36	Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (150mM NaCl; <i>pldδ</i>).	84
Obrázek 37	Graf rekonstrukce počtu mikrotubulů po aplikaci solného stresu (150mM).	85
Obrázek 38	Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (200mM NaCl; WT).	85
Obrázek 39	Rekonstrukce mikrotubulární sítě po aplikaci solného stresu (200mM NaCl; <i>pldδ</i>).	86

Obrázek 40 Graf rekonstrukce počtu mikrotubulů po aplikaci solného stresu (200mM)	86
Obrázek 41 Dlouhodobý vliv solného stresu na růst kořenů <i>A. thaliana</i> WT a <i>pldδ</i>	87
Obrázek 42 Analýza hlavních komponent (PCA).	89
Obrázek 43 Graf porovnání relativního množství vybraných sekundárních metabolitů	91

10. Seznam použité literatury

Abramovitch RB, Anderson JC and Martin GB. (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* **7** (8): 601-11.

Akpinar BA, Avsar B, Lucas SJ and Budak H. (2012) Plant abiotic stress signaling. *Plant Signaling and Behavior* **7** (11): 1450-5.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC and Ecker JR. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301** (5633): 653-657.

Ambrose JC and Cyr R. (2007) The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19** (1): 226-36.

Ambrose JC, Li W, Marcus A, Ma H and Cyr R. (2005) A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **16** (4): 1584-92.

Arisz SA, Testerink C and Munnik T. (2009) Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791** (9): 869-75.

Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C and Lescure B. (1992) A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* **30** (1): 123-128.

Bajer AS and Mole-Bajer J. (1986) Drugs with colchicine-like effects that specifically disassemble plant but not animal microtubules. *Annals of the New York Academy of Sciences* **466** (1): 767-784.

Bargmann BO, Laxalt AM, ter Riet B, Testerink C, Merquiol E, Mosblech A, Leon-Reyes A, Pieterse CM, Haring MA, Heilmann I, Bartels D and Munnik T. (2009 a) Reassessing the role of phospholipase D in the *Arabidopsis* wounding response. *Plant Cell Environment* **32** (7): 837-50.

Bargmann BO, Laxalt AM, ter Riet B, van Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D and Munnik T. (2009 b) Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiology* **50** (1): 78-89.

Bargmann BO and Munnik T. (2006) The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **9** (5): 515-22.

Baskin TI and Wilson JE. (1997) Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiology* **113** (1): 493-502.

- Bauer K.** (1939) Über Explantation "in vitro". *Ergebnisse Biol.* **16**: 336-512.
- Bechtold N, Ellis J and Pelletier G.** (1993) In planta *Agrobacterium*, mediated gene transfer by infiltration of *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences III* **316**: 1194-1199.
- Bernoux M, Ellis JG and Dodds PN.** (2011) New insights in plant immunity signaling activation. *Current Opinion in Plant Biology* **14** (5): 512-518.
- Block A and Alfano JR.** (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Current Opinion in Microbiology* **14** (1): 39-46.
- Block A, Li G, Fu ZQ and Alfano JR.** (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology* **11** (4): 396-403.
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS and Dupree P.** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiology* **137** (1): 104-16.
- Bouquin T, Mattsson O, Naested H, Foster R and Mundy J.** (2002) The *Arabidopsis lue1* mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *Journal of Cell Science* **116** (6): 791-801.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S and Gontier E.** (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* **161** (1): 839-851.
- Bringmann M, Landrein B, Schudoma C, Hamant O, Hauser MT and Persson S.** (2012) Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. *Trends in Plant Science* **17** (11): 666-74.
- Brock A, Herzfeld T, Paschke R, Koch M and Drager B.** (2006) Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry* **67** (18): 2050-7.
- Buhot N, Douliez JP, Jacquemard A, Marion D, Tran V, Maume BF, Milat ML, Ponchet M, Mikès V, Kader JC and Blein JP.** (2001) A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Letters* **509** (1): 27-30.
- Buhot N, Gomes E, Milat ML, Ponchet M, Marion D, Lequeu J, Delrot S, Coutos-Thevenot P and Blein JP.** (2004) Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Molecular Biology of the Cell* **15** (11): 5047-52.
- Carpenter JL, Ploense SE, Snustad DP and Silflow CD.** (1992) Preferential expression of an α -tubulin gene of *Arabidopsis* in pollen *The Plant Cell* **4**: 557-571.
- Cartea ME, Francisco M, Soengas P and Velasco P.** (2011) Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* **16** (1): 251-80.
- Claxton NS, Fellers TJ and Davidson MW.** (2011) Laser scanning confocal microscopy. <http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf> (19.11.2011). :

- Clough JS and Bent AF.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16** (6): 735-743.
- Clouse SD.** (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* **23** (4): 1219-30.
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL and Hedden P.** (2014) The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *The Journal of Experimental Biology* **217** (Pt 1): 67-75.
- Collings DA, Asada T, Allen NS and Shibaoka H.** (1998) Plasma membrane-associated actin in Bright Yellow 2 tobacco cells. *Plant Physiology* **118** (1): 917-928.
- Colombatti F, Gonzalez DH and Welchen E.** (2014) Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion* (Article in press):
- Cooper JA.** (1987) Effects of Cytochalasin and Phalloidin on actin. *The Journal of Cell Biology* **1105**: 1473-1478.
- Cooper JA.** (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of Cell Biology* **105**: 1473-1478.
- Craddock TJ, Tuszynski JA and Hameroff S.** (2012) Cytoskeletal signaling: is memory encoded in microtubule lattices by CaMKII phosphorylation? *PLoS Computational Biology* **8** (3): e1002421.
- D'Auria JC and Gershenzon J.** (2005) The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology* **8** (3): 308-16.
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J and Hirt H.** (2014) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* **32** (1): 40-52.
- Das L, Bhattacharya B and Basu G.** (2012) Rationalization of paclitaxel insensitivity of yeast β -tubulin and human β III-tubulin isotype using principal component analysis. *BioMed Central Research Notes* **5** (395): 1-10.
- Day RN and Davidson MW.** (2009) The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews* **38** (10): 2887-921.
- De Vos M, Van Zaanen W, Koornneef A, Korzelius JP, Dicke M, Van Loon LC and Pieterse CM.** (2006) Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142** (1): 352-63.
- Debeaujon I, Nesi N, Perez P, Devic M, Grandjean O, Caboche M and Lepiniec L.** (2003) Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* **15** (11): 2514-31.
- Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC and Klessig DF.** (2011) Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* **9**: e0156.

- Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TW and Munnik T.** (2003 a) Phospholipase d activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell* **15** (11): 2666-79.
- Dimitrov A, Quesnoit M, Moutel S, Cantaloube I, Poüs C and Perez F.** (2008) Detection of GTP-tubulin conformation *in vivo* reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* **322**: 1353-1356.
- Divi UK, Rahman T and Krishna P.** (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BioMed Central Plant Biology* **10**: 151.
- Dixit R and Cyr R.** (2004) The cortical microtubule array: from dynamics to organization. *The Plant Cell* **16**: 2546-2552.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C, Reddy MSS and Wang L.** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence — a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* **3** (5): 371-390.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM and Kazan K.** (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* **19** (7): 2225-45.
- Dong J and Chen W.** (2013) The role of autophagy in chloroplast degradation and chlorophagy in immune defenses during *Pst* DC3000 (AvrRps4) infection. *PLoS One* **8** (8): e73091.
- Dostál J and kolektiv.** (1989) Nová květena ČSSR. *Academia*, Praha. ISBN: 80-200-0095
- Drobak BK, Franklin-Tong VE and Staiger CJ.** (2004) The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytologist* **163** (1): 13-30.
- Duckett CM and Lloyd CW.** (1994) Gibberellic acid-induced microtubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an α -tubulin isotype. *The Plant Journal* **3**: 363-372.
- Durrant WE and Dong X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209.
- Erickson JL, Ziegler J, Guevara D, Abel S, Klösigen RB, Mathur J, Rothstein SJ and Schattat MH.** (2014) Agrobacterium-derived cytokinin influences plastid morphology and starch accumulation in *Nicotiana benthamiana* during transient assays. *BioMed Central Plant Biology* **14** (1): 127.
- Esposito D, Komarnytsky S, Shapses S and Raskin I.** (2011) Anabolic effect of plant brassinosteroid. *FASEB Journal* **25** (10): 3708-19.
- Flor HH.** (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296.

- Foissner I and Wasteneys GO.** (2007) Wide-ranging effects of eight cytochalasins and latrunculin A and B on intracellular motility and actin filament reorganization in characean internodal cells. *Plant Cell Physiology* **48** (4): 585-97.
- Fox JE, Starcevic M, Kow KY, Burow ME and McLachlan JA.** (2001) Nitrogen fixation. Endocrine disrupters and flavonoid signalling. *Nature* **413** (6852): 128-129.
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N and Dong X.** (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486** (7402): 228-32.
- Gardiner J, Collings DA, Harper JD and Marc J.** (2003) The effects of the phospholipase D-antagonist 1-butanol on seedling development and microtubule organisation in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* **44** (7): 687-696.
- Gardiner J, Harper JDI, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ and Marc J.** (2001) A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell* **13**: 2143-2158.
- Gilliland LU, Kandasamy MK, Pawloski LC and Meagher RB.** (2002) Both vegetative and reproductive actin isoforms complement the stunted root hair phenotype of the Arabidopsis *act2-1* mutation. *Plant Physiology and Biochemistry* **130** (4): 2199-209.
- Gilliland LU, Pawloski LC, Kandasamy MK and Meagher RB.** (2003) Arabidopsis actin gene *ACT7* plays an essential role in germination and root growth. *The Plant Journal* **33**: 319-328.
- Gray JC, Hansen MR, Shaw DJ, Graham K, Dale R, Smallman P, Natesan SK and Newell CA.** (2012) Plastid stromules are induced by stress treatments acting through abscisic acid. *Plant Journal* **69** (3): 387-98.
- Gutierrez R, Lindeboom JJ, Paredez AR, Emons AM and Ehrhardt DW.** (2009) Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11** (7): 797-806.
- Ha KS and Exton JH.** (1993) Activation of actin polymerization by phosphatidic acid derived from phosphatidylcholine in IIC9 fibroblasts *Journal of Cell Biology* **123** (6): 1789-1796.
- Hamada T.** (2007) Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research* **120** (1): 79-98.
- Hamada T, Tominaga M, Fukaya T, Nakamura M, Nakano A, Watanabe Y, Hashimoto T and Baskin TI.** (2012) RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and endoplasmic reticulum tubule junctions frequently pause at cortical microtubules. *Plant Cell Physiology* **53** (4): 699-708.

- Hammond JW, Cai D and Verhey KJ.** (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Plant Biology* **20** (1): 71-6.
- Hanson MR and Sattarzadeh A.** (2011) Stromules: recent insights into a long neglected feature of plastid morphology and function. *Plant Physiology* **155** (4): 1486-92.
- Hardham AR and Gunning BES.** (1978) Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *Journal of Cell Biology* **77** (1): 14-34.
- Hardham AR and Gunning BES.** (1978) Structure of microtubule arrays in plant cells. *Journal of Cell Biology* **77**: 14-34.
- Hardham AR, Jones DA and Takemoto D.** (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10** (4): 342-8.
- Hardham AR, Takemoto D and White RG.** (2008) Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of Arabidopsis epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BioMed Central Plant Biology* **8**: 63.
- Heath M.** (2000) Hypersensitive response-related cell death. *Plant and Molecular Biology* **44** (0): 321-334.
- Heidrich K, Wirthmueller L, Tasset C, Pouzet C, Deslandes L and Parker JE.** (2011) Arabidopsis EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science* **334** (6061): 1401-4.
- Heil M and Ton J.** (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci* **13** (6): 264-72.
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S and Mullineaux PM.** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **42**: 819-832.
- Henty-Ridilla JL, Li J, Day B and Staiger CJ.** (2014) ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 regulates actin dynamics during innate immune signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **26** (1): 340-52.
- Henty-Ridilla JL, Shimono M, Li J, Chang JH, Day B and Staiger CJ.** (2013) The plant actin cytoskeleton responds to signals from microbe-associated molecular patterns. *PLoS Pathogens* **9** (4): e1003290.
- Henty JL, Bledsoe SW, Khurana P, Meagher RB, Day B, Blanchoin L and Staiger CJ.** (2011) Arabidopsis actin depolymerizing factor4 modulates the stochastic dynamic behavior of actin filaments in the cortical array of epidermal cells. *Plant Cell* **23** (10): 3711-26.
- Higaki T, Goh T, Hayashi T, Kutsuna N, Kadota Y, Hasezawa S, Sano T and Kuchitsu K.** (2007) Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: *in vivo* imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology* **48** (10): 1414-25.

- Higaki T, Kurusu T, Hasezawa S and Kuchitsu K.** (2011) Dynamic intracellular reorganization of cytoskeletons and the vacuole in defense responses and hypersensitive cell death in plants. *Journal of Plant Research* **124** (3): 315-24.
- Hild G, Bugyi B and Nyitrai M.** (2010) Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67** (10): 609-29.
- Ho AYY, Day AD, Brown MH and Marc J.** (2009) *Arabidopsis* phospholipase D δ as an initiator of cytoskeleton-mediated signalling to fundamental cellular processes. *Functional Plant Biology* **36**: 190-198.
- Homann U, Meckel T, Hewing J, Hutt MT and Hurst AC.** (2007) Distinct fluorescent pattern of KAT1::GFP in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *European Journal of Cell Biology* **86** (8): 489-500.
- Hong Y, Zhang W and Wang X.** (2010) Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell and Environment* **33** (4): 627-35.
- Huang S, Gao L, Blanchoin L and Staiger CJ.** (2006) Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is regulated by phosphatidic acid. *Molecular Biology of the Cell* **17** (4): 1946-58.
- Hussey PJ.** (2004) The plant cytoskeleton in cell differentiation and development. *Blackwell publishing*, Oxford, UK. ISBN: 1-84127-421-6
- Hussey PJ, Ketelaar T and Deeks MJ.** (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review in Plant Biology* **57**: 109-125.
- Hwang JU and Lee Y.** (2001) Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium level and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology* **125**: 2120-2128.
- Chen G, Snyder CL, Greer MS and Weselake RJ.** (2011) Biology and Biochemistry of Plant Phospholipases. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30** (3): 239-258.
- Cheon J, Park SY, Schulz B and Choe S.** (2010) *Arabidopsis* brassinosteroid biosynthetic mutant dwarf7-1 exhibits slower rates of cell division and shoot induction. *BioMed Central Plant Biology* **10**: 270.
- Chu B, Snustad DP and Carter JV.** (1993) Alteration of β -tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana* *Plant Physiology* **103**: 371-377.
- Chuong SD, Park NI, Freeman MC, Mullen RT and Muench DG.** (2005) The peroxisomal multifunctional protein interacts with cortical microtubules in plant cells. *BioMed Central Plant Biology* **6**: 40.
- Illes P, Schlicht M, Pavlovkin J, Lichtscheidl I, Baluska F and Ovecka M.** (2006) Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *The Journal of Experimental Biology* **57** (15): 4201-13.

- Ismail A, Takeda S and Nick P.** (2014) Life and death under salt stress: same players, different timing? *Journal of Experimental Botany* **10.1093/xb/eru159**:
- Jia Y, Tao F and Li W.** (2013) Lipid profiling demonstrates that suppressing Arabidopsis phospholipase Ddelta retards ABA-promoted leaf senescence by attenuating lipid degradation. *PLoS One* **8** (6): e65687.
- Jiang J, Fan LW and Wu WH.** (2005) Evidences for involvement of endogenous cAMP in Arabidopsis defense responses to Verticillium toxins. *Cell Research* **15** (8): 585-592.
- Jones DA and Takemoto D.** (2004) Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16** (1): 48-62.
- Kalachova T, Iakovenko O, Kretinin S and Kravets V.** (2013) Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiol Biochem* **66**: 127-33.
- Katagiri K, Takahashi S and Shinozaki K.** (2001) Involvement of a novel Arabidopsis phospholipase D, AtPLDd, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *Plant Journal* **26** (0): 595-605.
- Kazan K and Manners JM.** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science* **17** (1): 22-31.
- Kliebenstein DJ.** (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant , Cell and Environment* **27**: 675-684.
- Kobayashi Y and Kobayashi I.** (2007) Depolymerization of the actin cytoskeleton induces defense responses in tobacco plants. *Journal of General Plant Pathology* **73** (5): 360-364.
- Kobayashi Y, Kobayashi I, Funaki Y, Fujimoto S, Takemoto T and Kunoh H.** (1997) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant Journal* **11**: 525-537.
- Koenraad FM, Tierens J, Thomma BP, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue BPA and Broekaert WF.** (2001) Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens *Plant Physiology* **125**: 1688-1699.
- Kohli A, Sreenivasulu N, Lakshmanan P and Kumar PP.** (2013) The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **32** (7): 945-57.
- Komis G, Mistrik M, Samajova O, Doskocilova A, Ovecka M, Illes P, Bartek J and Samaj J.** (2014) Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy. *Plant Physiology* **165** (1): 129-48.
- Koornneef A and Pieterse CM.** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* **146** (3): 839-44.

Kopczak SD, Haas NA, Hussey PJ, Silflow CD and Snustad DP. (1992) The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *The Plant Cell* **4**: 539-547.

Krinke O, Flemr M, Vergnolle C, Collin S, Renou JP, Taconnat L, Yu A, Burketova L, Valentova O, Zachowski A and Ruelland E. (2009) Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology* **150** (1): 424-36.

Kruszka K, Pieczynski M, Windels D, Bielewicz D, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z and Vazquez F. (2012) Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *Journal of Plant Physiology* **169** (16): 1664-72.

Krzyszowiec W, Rajwa B, Dobrucki J and Gabrys H. (2007) Actin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* under blue and red light. *Biology of the Cell* **99** (5): 251-60.

Kumar D and Klessig DF. (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100** (26): 16101-6.

Kwok EY and Hanson MR. (2004) Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Reports* **23** (4): 188-95.

Lascombe MB, Bakan B, Buhot N, Marion D, Blein JP, Larue V, Lamb C and Prange T. (2008) The structure of "defective in induced resistance" protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. *Protein Science* **17** (9): 1522-30.

Li J, Henty-Ridilla JL, Huang S, Wang X, Blanchoin L and Staiger CJ. (2012) Capping protein modulates the dynamic behavior of actin filaments in response to phosphatidic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24** (9): 3742-54.

Li M, Hong Y and Wang X. (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791** (9): 927-35.

Liu B. (2011) The plant cytoskeleton. *Springer*, New York. e-ISBN:978-1-4419-0987-9

Liu J, Elmore JM, Lin ZJ and Coaker G. (2011) A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host and Microbe* **9** (2): 137-46.

Liu P, Li RL, Zhang L, Wang QL, Niehaus K, Baluska F, Samaj J and Lin JX. (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant Journal* **60** (2): 303-13.

Loake G and Grant M. (2007) Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* **10** (5): 466-72.

Louis J, Gobbato E, Mondal HA, Feys BJ, Parker JE and Shah J. (2012) Discrimination of *Arabidopsis* PAD4 activities in defense against green peach aphid and pathogens. *Plant Physiology* **158** (4): 1860-72.

- Maekawa T, Kufer TA and Schulze-Lefert P.** (2011) NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology* **12** (9): 817-26.
- Maffei ME, Mithöfer A and Boland W.** (2007) Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends in Plant Science* **12** (7): 310-316.
- Mahajan S and Tuteja N.** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444** (2): 139-58.
- Malinsky J, Opekarova M, Grossmann G and Tanner W.** (2013) Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. *Annual Review in Plant Biology* **64**: 501-29.
- Marc J, Sharkey DE, Durso NA, Zhang M and Cyr RJ.** (1996) Isolation of a 90-kDa microtubule associated protein from tobacco membranes. *The Plant Cell* **8**: 2127-2138.
- Martin A, Lang D, Heckmann J, Zimmer AD, Vervliet-Scheebaum M and Reski R.** (2009) A uniquely high number of *ftsZ* genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biology* **11** (5): 744-50.
- Martin GB, Bogdanove AJ and Sessa G.** (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review in Plant Biology* **54**: 23-61.
- Mathur J, Mammone A and Barton KA.** (2012) Organelle extensions in plant cells. *Journal of Integrative Plant Biology* **54** (11): 851-67.
- Matouskova J, Janda M, Fiser R, Sasek V, Kocourkova D, Burketova L, Duskova J, Martinec J and Valentova O.** (2014) Changes in actin dynamics are involved in salicylic acid signaling pathway. *Plant Science* **223**: 36-44.
- Mattanovich D, Himmler G, Laimer M, Maiss E, Reqner F, Da Camara Machado A, Hanzer V, Casper R and Katinger HW.** (1989) Expression of the plum pox virus coat protein gene region in *Escherichia coli*. *Virus Genes* **2**: 119-127.
- McCurdy DW, Kovar DR and Staiger CJ.** (2001) Actin and actin-binding proteins in higher plants *Protoplasma* **215**: 89-104.
- McLoughlin F, Galvan-Ampudia CS, Julkowska MM, Caarls L, van der Does D, Lauriere C, Munnik T, Haring MA and Testerink C.** (2012) The Snf1-related protein kinases SnRK2.4 and SnRK2.10 are involved in maintenance of root system architecture during salt stress. *Plant Journal* **72** (3): 436-49.
- Meijer HJ and Munnik T.** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review in Plant Biology* **54**: 265-306.
- Meyer D, Pajonk S, Micali C, O'Connell R and Schulze-Lefert P.** (2009) Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *Plant Journal* **57** (6): 986-99.

- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H and Michelmore RW.** (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **15** (4): 809-34.
- Miura K and Tada Y.** (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* **5**: 4.
- Möllers C, Nehlin L, Glimelius K and Iqbal MCM.** (1999) Influence of in vitro culture conditions on glucosinolate composition of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *Physiology of Plant* **107** (1): 441-446.
- Moore RC and Cyr RJ.** (2000) Association between elongation factor-1alpha and microtubules in vivo is domain dependent and conditional. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **45** (4): 279-292.
- Morton WM, Ayscough KR and McLaughlin PJ.** (2000) Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature Cell Biology* **2**: 736-738.
- Motes CM, Pechter P, Yoo CM, Wang YS, Chapman KD and Blancaflor EB.** (2005) Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-acyl ethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and Arabidopsis seedling growth. *Protoplasma* **226** (3-4): 109-23.
- Muller S, Smertenko A, Wagner V, Heinrich M, Hussey PJ and Hauser MT.** (2004) The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Current Biology* **14** (5): 412-7.
- Munnik T and Vermeer JEM.** (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **33** (4): 655-669.
- Murashige T and Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T and Hasebe M.** (2005) Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7** (10): 961-8.
- Murphy AS, Peer WA and Schulz B.** (2011) The plant plasma membrane. *Springer Verlag*, London. ISBN: 978-3-642-13430-2
- Muthamilarasan M and Prasad M.** (2013) Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences* **38** (2): 433-449.
- Nagata T, Nemoto Y and Hasezawa S.** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**: 1-30.
- Nair RB, Bastress KL, Ruegger MO, Denault JW and Chapple C.** (2004) The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16** (2): 544-54.

Nakajima K, Furutani I, Tachimoto H, Matsubara H and Hashimoto T. (2004) SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding Arabidopsis cells. *Plant Cell* **16** (5): 1178-90.

Nakano RT, Yamada K, Bednarek P, Nishimura M and Hara-Nishimura I. (2014) ER bodies in plants of the *Brassicales* order: biogenesis and association with innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **5**: 73.

Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O and Jones JD. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312** (5772): 436-9.

Nick P. (2008) Plant microtubules. *Springer-Verlag*, Heidelberg. ISBN: 978-3-540-77175-3
Nicolson GL. (2014) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta* **1838** (6): 1451-66.

Nielsen ME, Feechan A, Bohlenius H, Ueda T and Thordal-Christensen H. (2012) Arabidopsis ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **109** (28): 11443-8.

Novotna Z, Linek J, Hynek R, Martinec J, Potocky M and Valentova O. (2003) Plant PIP 2 -dependent phospholipase D activity is regulated by phosphorylation. *FEBS Letters* **554**: 50-54.

Oda Y and Fukuda H. (2012) Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* **337** (6100): 1333-6.

Ou GS, Chen ZL and Yuan M. (2001) Jasplakinolide reversibly disrupts actin filaments in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **219**: 168-175.

Panda D, Miller HP, Banerjee A, Ludueña RF and Wilson L. (1994) Microtubule dynamics *in vitro* are regulated by the tubulin isotype composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**: 11358-11362.

Pape S, Thurow C and Gatz C. (2010) The Arabidopsis PR-1 promoter contains multiple integration sites for the coactivator NPR1 and the repressor SNI1. *Plant Physiology* **154** (4): 1805-18.

Parrotta L, Cai G and Cresti M. (2010) Changes in the accumulation of alpha- and beta-tubulin during bud development in *Vitis vinifera* L. *Planta* **231** (2): 277-91.

Pauwels L and Goossens A. (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23** (9): 3089-100.

Pedras MSC, Okanga FI, Zaharia IL and Khan AQ. (2000) Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* **53**: 161-176.

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A and Van Wees SC. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489-521.

Pinosa F, Buhot N, Kwaaitaal M, Fahlberg P, Thordal-Christensen H, Ellerstrom M and Andersson MX. (2013) Arabidopsis phospholipase D δ is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi. *Plant Physiology* **163** (2): 896-906.

Pleskot R, Li J, Zarsky V, Potocky M and Staiger CJ. (2013) Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in Plant Science* **18** (9): 496-504.

Pleskot R, Potocky M, Pejchar P, Linek J, Bezvoda R, Martinec J, Valentova O, Novotna Z and Zarsky V. (2010) Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. *Plant J* **62** (3): 494-507.

Pleskot R, Potocky M, Pejchar P, Linek J, Bezvoda R, Martinec J, Valentova O, Novotna Z and Zarsky V. (2010) Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. *Plant Journal* **62** (3): 494-507.

Pokotylo I, Kolesnikov Y, Kravets V, Zachowski A and Ruelland E. (2014) Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme. *Biochimie* **96**: 144-57.

Qiao F, Chang XL and Nick P. (2010) The cytoskeleton enhances gene expression in the response to the Harpin elicitor in grapevine. *Journal of Experimental Botany* **61** (14): 4021-31.

Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T and Riazuddin S. (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* **27** (6): 753-63.

Regente MC, Giudici AM, Villalain J and de la Canal L. (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology* **40** (3): 183-9.

Reichelt M, Brown PD, Schneider B, Oldham NJ, Stauber E, Tokuhisa J, Mitchell-Olds T and Gershenzon J. (2002) Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **59**: 663-671.

Rivas-San Vicente M and Plasencia J. (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **62** (10): 3321-38.

Robatzek S, Chinchilla D and Boller T. (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes and Development* **20** (5): 537-42.

Robert-Seilaniantz A, Grant M and Jones JD. (2011 a) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 317-43.

Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, Hill L, Yamaguchi S, Kamiya Y and Jones JD. (2011 b) The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant Journal* **67** (2): 218-31.

Rodriguez-Milla MA and Salinas J. (2009) Prefoldins 3 and 5 play an essential role in Arabidopsis tolerance to salt stress. *Mol Plant* **2** (3): 526-34.

Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, De Rycke R, Kushnir S, Van Doorselaere J, Joseleau JP, Vuylsteke M, Van Driessche G, Van Beeumen J, Messens E and Boerjan W. (2004) Molecular phenotyping of the pal1 and pal2 mutants of Arabidopsis thaliana reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* **16** (10): 2749-71.

Ronald PC and Beutler B. (2010) Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science* **330** (6007): 1061-4.

Sampathkumar A, Lindeboom JJ, Debolt S, Gutierrez R, Ehrhardt DW, Ketelaar T and Persson S. (2011) Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in Arabidopsis. *Plant Cell* **23** (6): 2302-13.

Scott I, Sparkes IA and Logan DC. (2007) The missing link: inter-organellar connections in mitochondria and peroxisomes? *Trends in Plant Science* **12** (9): 380-1; author reply 381-3.

Semwogerere D and Weeks ER. (2008) Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering II. Edition. eBook. ISBN: 9781420078039

Sept D, Xu JY, Pollard TD and McCammon JA. (1999) Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophysical Journal* **77**: 2911-2919.

Sheikholeslam SN and Weeks DP. (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* **8** (4): 291-298.

Shih YL and Rothfield L. (2006) The bacterial cytoskeleton. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70** (3): 729-54.

Schweizer F, Fernandez-Calvo P, Zander M, Diez-Diaz M, Fonseca S, Glauser G, Lewsey MG, Ecker JR, Solano R and Reymond P. (2013) *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* **25** (8): 3117-32.

Singer SJ and Nicolson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175** (0): 720-731.

Skoog F and Miller CO. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**: 118-131.

Smekalova V, Doskocilova A, Komis G and Samaj J. (2014) Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32** (1): 2-11.

Snustad DP, Haas NA, Kopczak SD and Silflow CD. (1992) The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed β -tubulin genes *American Society of Plant Physiologists* **4**: 549-556.

Sonderby IE, Burow M, Rowe HC, Kliebenstein DJ and Halkier BA. (2010) A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **153** (1): 348-63.

Spector I, Shochet NR, Blasberger D and Kashman Y. (1989) Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motility and Cytoskeleton* **13** (3): 127-144.

Spoel SH and Dong X. (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews. Immunology* **12** (2): 89-100.

Staiger CJ, Baluška F and Volkmann D. (2000) Actin: A dynamic framework for multiple plant cell functions. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht. ISBN: 0-7923-6412-0

Staiger CJ, Sheahan MB, Khurana P, Wang X, McCurdy DW and Blanchoin L. (2009) Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *Journal of Cell Biology* **184** (2): 269-80.

Stakman EC. (1915) Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research* **4** (0): 193-200.

Stierle A, Strobel G and Stierle D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* **260** (5105): 214-216.

Strádalová V, Stahlschmidt W, Grossmann G, Blažíková M and Rachel R. (2009) Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *Journal of Cell Science* **122** (0): 2887-2894.

Sugimoto K, Jiao Y and Meyerowitz EM. (2010) *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell* **18** (3): 463-71.

Summematter K, Sticher L and Métraux JP. (1995) Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology* **108**: 1379-1385.

Sutter JU, Campanoni P, Tyrrell M and Blatt MR. (2006) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *Plant Cell* **18** (4): 935-54.

Šimandl P. (2011) Příprava transgenních linií *Arabidopsis thaliana* pro studium interakce fosfolipasy D s cytoskeletem. *Diplomová práce VŠCHT Praha, Česká republika*

Tabata H. (2006) Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Current Drug Targets* **7** (4): 453-61.

Tanaka H, Ishikawa M, Kitamura S, Takahashi Y, Soyano T, Machida C and Machida Y. (2004) The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis. *Genes to Cells* **9** (12): 1199-211.

Taviera M, Pereira DM, Sousa C, Ferreres F, Andrade PB, Martins A, Pereira JA and Valentao P. (2009) *In vitro* cultures of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC: potential plant bioreactor for antioxidant phenolic compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57** (1): 1247-1252.

Tholl D, Chen F, Petri J, Gershenzon J and Pichersky E. (2005) Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from Arabidopsis flowers. *Plant Journal* **42** (5): 757-71.

Tian M, Chaudhry F, Ruzicka DR, Meagher RB, Staiger CJ and Day B. (2009) Arabidopsis actin-depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal transduction triggered by the *Pseudomonas syringae* effector AvrPphB. *Plant Physiology* **150** (2): 815-24.

Tischfield MA, Cederquist GY, Gupta ML, Jr. and Engle EC. (2011) Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Current Opinion in Genetics and Development* **21** (3): 286-94.

Traka M and Mithen R. (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews* **8** (1): 269-282.

Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A and Hussey PJ. (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4** (9): 711-4.

Ueda K, Matsuyama T and Hashimoto T. (1999) Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **206**: 201-206.

Ueki S, Lacroix B, Krichevsky A, Lazarowitz SG and Citovsky V. (2009) Functional transient genetic transformation of Arabidopsis leaves by biolistic bombardment. *Nature Protocols* **4** (1): 71-7.

Uquillas C, Letelier I, Bianco F, Jordana X and Holuige L. (2004) NPR1-Independent Activation of Immediate Early Salicylic Acid-Responsive Genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17** (1): 34-42

Vailleau F, Daniel X, Tronchet M, Montillet JL, Triantaphylides C and Roby D. (2002) A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99** (15): 10179-84.

Valiron O, Caudron N and Job D. (2001) Microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 2069-2084.

Valvekens D, Montegu MV and Lijsebettens MV. (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85** (15): 5536-5540.

Van Loon LC, Rep M and Pieterse CMJ. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162.

Van Poecke RMP, Posthumus MA and Dicke M. (2001) Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *Journal of Chemical Ecology* **27** (1): 1911-1928.

Veit M and Pauli GF. (1999) Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Natural Products* **62** (9): 1301-1303.

Velišek J and Hajšlová J. (2009) *Chemie potravin II. OSSIS*, Praha. ISBN: 978-8086659-17-6

Vercammen J, Pham-Tuan H, Arickx I, Van der Straeten D and Sandra P. (2001) Monitoring of isothiocyanates emanating from *Arabidopsis thaliana* upon paraquat spraying. *Journal of Chromatography A* **912** (1): 127-134.

Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F and Chory J. (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21** (1): 177-201.

Vlot AC, Dempsey DA and Klessig DF. (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 177-206.

Vogt T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* **3** (1): 2-20.

Voigt B, Timmers AC, Samaj J, Muller J, Baluska F and Menzel D. (2005) GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European Journal of Cell Biology* **84** (6): 595-608.

Voigt B, Timmers ACJ, Šamaj J, Müller J, Baluška F and Menzel D. (2005) GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European Journal of Cell Biology* **84** (6): 595-608.

Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC and Elson EL. (2001) Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of Cell Science* **114**: 1025-1036.

Walters D and Heil M. (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**: 3-17.

Wang C, Li J and Yuan M. (2007) Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* **48** (11): 1534-47.

- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH and Dong X.** (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17** (20): 1784-90.
- Wang S, Kurepa J, Hashimoto T and Smalle JA.** (2011) Salt stress-induced disassembly of Arabidopsis cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1. *Plant Cell* **23** (9): 3412-27.
- Wang X.** (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **5** (0): 408-414.
- Wasteneys GO and Yang Z.** (2004) The cytoskeleton becomes multidisciplinary. *Plant Physiology* **136** (4): 3853-4.
- Westermann S and Weber K.** (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (12): 938-948.
- Wicker-Planquart C, Stoppin-Mellet V, Blanchoin L and Vantard M.** (2004) Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *The Plant Journal* **39**: 126-134.
- Wilson PG and Borisy GG.** (1997) Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *Bioessays* **19** (6): 451-454.
- Xing F, Li Z, Sun A and Xing D.** (2013) Reactive oxygen species promote chloroplast dysfunction and salicylic acid accumulation in fumonisin B1-induced cell death. *FEBS Letters* **587** (14): 2164-72.
- Yeats TH and Rose JK.** (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science* **17** (2): 191-8.
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Niida R and Saito K.** (2007) Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in Arabidopsis by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. *Journal of Biological Chemistry* **282** (20): 14932-41.
- Yu K, Soares JM, Mandal MK, Wang C, Chanda B, Gifford AN, Fowler JS, Navarre D, Kachroo A and Kachroo P.** (2013) A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Reports* **3** (4): 1266-78.
- Yu L, Nie J, Cao C, Jin Y, Yan M, Wang F, Liu J, Xiao Y, Liang Y and Zhang W.** (2010) Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **188** (3): 762-73.
- Yuan HY, Yao LL, Jia ZQ, Li Y and Li YZ.** (2006) *Verticillium dahliae* toxin induced alterations of cytoskeletons and nucleoli in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Protoplasma* **229** (1): 75-82.

Zavala JA and Baldwin IT. (2006) Jasmonic acid signalling and herbivore resistance traits constrain regrowth after herbivore attack in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell and Environment* **29** (9): 1751-60.

Zhang Q, Lin F, Mao T, Nie J, Yan M, Yuan M and Zhang W. (2012) Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24** (11): 4555-76.

Zheng Y, Schumaker KS and Guo Y. (2012) Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109** (0): 12822-28227.

Přílohy

Příloha 1: Použité laboratorní přístroje a chemikálie

Přístroje

Analytické váhy AE 200	Mettler, Švýcarsko
Analytické váhy PM 300	Mettler, Švýcarsko
Autokláv Tuttnauer 3870M	Costrad, ČR
Box s laminárním prouděním Clean-Air Clean	Air Techniek, Nizozemsko
Centrifuga Z216MK	Hermle, Německo
Centrifuga Mikro 120	Hettich, Německo
Fast Prep, homogenizační přístroj	MP Biomedicals, USA
GeneGun Helios PDS 1000/He	Bio-Rad, USA
Konfokální mikroskop Zeiss LSM 5 Duo	Zeiss, Německo
Magnetické míchadlo RCT basic	IKA, Německo
Mikrovlnná trouba Eta 0205	Eta, Česká republika
pH metr 526 MultiCal	WTW, Německo
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, USA
Spinning disk confocal microscope, Olympus IX81-Andor SDCM	Olympus, USA Andor, UK
System na purifikaci vody Millipore Direct-Q3	Millipore, USA
Termální cykler MJ Mini	Bio-Rad, USA
Třepačka KS 250 basic	IKA, Německo
Třepačka OS5 basic	IKA, Německo
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zdroj pro horizontální a vertikální elektroforesu	Bio-Rad, USA

Chemikálie

2,4 D	Sigma Aldrich, USA
1 kb DNA Ladder	Fermentas, Kanada
Acetosyringon	Sigma Aldrich, USA
Agar Noble	Difco, USA
Agarosa	Sigma Aldrich, USA
Ampicilin	Serva, Německo
Biotin	Sigma Aldrich, USA
BAP (6-benzylaminopurin)	Sigma Aldrich, USA
BSA – bovinní sérum	Serva, Německo
CaCl ₂	Penta, ČR
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Lachner, ČR
Cefotaxim	Sigma Aldrich, USA
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma Aldrich, USA

CuSO ₄ .5H ₂ O	Chemapol, ČR
Cytochalasin D	Sigma Aldrich, USA
DMSO (dimethyl sulfoxid)	Sigma Aldrich, USA
dNTP směs	Takara, Japonsko
DTT	Serva, Německo
EGTA	Sigma Aldrich, USA
Ethanol 99%, molecular grade	Sigma Aldrich, USA
Flg22	Sigma Aldrich, USA
FM4-64, {N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-[6-(4-(diethylamino) fenyl) hexatrienyl] pyridinium dibromide}	Life Technologies, USA
Gamborg B5 medium	Duchefa, Nizozemsko
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas
Glutaraldehyd 8%	Fluka Biochimika
Glycin	Sigma Aldrich, USA
FeSO ₄ .7H ₂ O	Penta, ČR
H ₃ BO ₃	Lachema, ČR
HBA – 4-hydroxybenzoová kyselina	Sigma Aldrich, USA
CHAPS (3-([3-cholamidopropyl]dimethylammonio)-1-propanesulfonát)	Sigma Aldrich, USA
Isopropanol	Lachema, ČR
Interkalační činidlo GelRed	Biotium, USA
Jasplakinolid	Sigma Aldrich, USA
Jehněčí sérum	Gibco, USA
Kanamycin	Serva, Německo
Kasein	Duchefa Biochemie, Nizozemsko
KCl	Lachema, ČR
Kinetin, 6-fufurylaminopurin	Duchefa Biochemie, Nizozemsko
KH ₂ PO ₄	Lachema, ČR
KNO ₃	Penta, ČR
Kvasničný extrakt	Bio-Rad, USA
Kyselina fosfatidová – - 1,2-dioktanoyl-sn-glycero-3-fosfát, sodná sůl	Sigma Aldrich, USA
Kyselina 4-hydroxybenzoová	Sigma Aldrich, USA
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina salicylová	Sigma Aldrich, USA
Latrunkulin B	Sigma Aldrich, USA
Loading dye 6x	Fermentas, Německo
Masový extrakt	Fluka, Německo
Methanol	Lachema, ČR
Methyljasmonát	Sigma Aldrich, USA
Mini Elute, Cleanup Kit pro čištění DNA	Qiagen, Nizozemí
MnCl ₂ .4H ₂ O	Sigma Aldrich, USA
Myo-Inositol	Sigma Aldrich, USA

MgCl ₂	Sigma Aldrich, USA
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich, USA
NaCl	Lachner, ČR
NAA	Lachema, ČR
Na ₂ MoO ₄	Sigma Aldrich, USA
Na ₂ EDTA	MP Biomedicals, USA
Niacin	Sigma Aldrich, USA
Oryzalin	Sigma Aldrich, USA
Paclitaxel	MP, Biomedicals, USA
Panhotenan vápenatý	Sigma Aldrich, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, USA
Pectinase z <i>Aspergillus niger</i>	Sigma Aldrich, USA
Pectolyase	MP, Biomedicals, USA
Peletovaná zemina Jiffy 41 mm	Jiffy Group, Norsko
Pfu DNA polymerasa	Thermo Fisher Scientific, USA
PIPES (kys. piperazin-NN'-bis(2-ethansulfonová))	Sigma Aldrich, USA
pJET, Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Plasmid Plus Midi Kit sestava pro purifikaci DNA	Qiagen, Nizozemí
Protilátka myši IgM, monoklonální antitubulin DM1α	Sigma Aldrich, USA
Protilátka sekundární konjugovaná s TRITC, antimyši	Sigma Aldrich, USA
Pyridoxin	Sigma Aldrich, USA
Restrikční enzymy	New England Biolab, UK
Rifampicin	MP Biomedicals, USA
Sacharosa	Penta, ČR
Savo	Bochemie, ČR
SDS	Sigma Aldrich, USA
Silwet L-77, heptamethyltrisiloxan modifikovaný	Crompton, USA
Směs inhibitorů proteas pro použití u rostlin	Sigma Aldrich, USA
Spectinomycin	Sigma Aldrich, USA
Spermidin	Biotech, ČR
Taq DNA polymerasa	Takara, Japonsko
Thiamin hydrochlorid	Sigma Aldrich, USA
Tris báze	Sigma Aldrich, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, USA
Wizard Plus SV Minipreps sestava pro purifikaci DNA	Promega, USA
x-gal (Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galaktosid)	Biotech, ČR
Zahradnický substrát	Agro CS, ČR
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Lachema, ČR

Příloha 2: Roztoky a kultivační media

ARA médium	(1l média)
sacharosa	10 g
agar	20 g
roztok Mikroprvky	10 ml
roztok Makroprvky	100 ml
doplnit destilovanou vodou na 1l, upravit pH na 5,8, sterilizace v autoklávu	
poté sterilně přidat:	
roztok Vitamíny ARA	10 ml
roztok Železo	10 ml
roztok CaCl ₂ XM	10 ml

Roztok Mikroprvky	(1l roztoku)
H ₃ BO ₃	430 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	280 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	13 mg
Na ₂ MoO ₄	5 mg
NaCl	58 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	29 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25 mg
doplnit destilovanou vodou na 1l, sterilizace v autoklávu	

Roztok Makroprvky	(1l roztoku, sterilizace v autoklávu)
KNO ₃	5,06 g
KH ₂ PO ₄	3,04 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,93 g
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4,72 g
doplnit destilovanou vodou na 1l, sterilizace v autoklávu	

Roztok Vitamíny ARA	(1l roztoku, sterilizace filtrací)
myo-inositol	10 g
panhotenan vápenatý	0,1 g
niacin	0,1 g
pyridoxin	0,1 g
thiamin hydrochlorid	0,1 g
biotin	0,001 g
doplnit destilovanou vodou na 1l	

Roztok Železo	(1l roztoku, sterilizace filtrací)
Na ₂ EDTA	3,722 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,115 g
doplnit destilovanou vodou na 1l	

MS medium	(1l roztoku, pH 5,7, sterilizace v autoklávu)
MS basal salt s vitamíny	4,4 g
sacharosa	10 g
agar	12 g
doplnit destilovanou vodou na 1l	
ev. NaCl (pro 150 mM roztok)	8,77 g
NaCl (pro 200 mM roztok)	11,69 g

BY-2 medium	(1l roztoku, pH 5,7, sterilizace v autoklávu)
MS Basal Salt	4,33 g
thiamin	0,001 g
roztok 2,4D	2 ml
KH ₂ PO ₄ anhydrát	0,2 g
inositol	0,1 g
sacharosa	30 g

Hellerovo (V4) medium	(1l roztoku, pH 5,7, sterilizace v autoklávu)
Roztok A	100 ml
Roztok B	10 ml
Roztok C	1 ml
Roztok D	10 ml
Inositol	0,1 g
Caseinhydrolyzát	1 g
sacharosa	30 g
NAA (cíl 53,7 µM)	10 ml
2,4-D (cíl 45,2 µM)	10 ml
Vitamíny	10 ml

Zásobní roztok 2,4-D pro BY-2 i hellerovo médium (4,52 mM; 100ml zás. roztoku)
 10 mg 2,4-D rozpustit v 1-1,5ml 1N NaOH a doplnit horkou destilovanou vodou na 100 ml.

Zásobní roztok NAA pro hellerovo (V4) médium (5,37 mM; 100ml zásobního roztoku)
 10 mg NAA rozpustit v 1-1,5ml 1N NaOH a doplnit horkou destilovanou vodou na 100 ml.

Roztok A pro hellerovo (V4) medium	(1l roztoku)
KCl	7,6 g
NaNO ₃	6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1,25 g

Roztok B pro hellerovo (V4) medium	(1l roztoku)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,5 g

Roztok C pro hellerovo (V4) medium (1l roztoku)

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₄	1 g
KI	0,01 g
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0,03 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,03 g

Roztok D pro hellerovo (V4) medium (1l roztoku)

Na ₂ EDTA	3,72 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78 g

Roztok Vitaminů pro hellerovo (V4) medium (1l roztoku)

B1 (thiamin)	0,01 g
B6 (pyridoxin)	0,01 g
Kyselina nikotinová	0,05 g
Glycin	0,3 g

Floral-dip medium (1 l media, pH 5,7, sterilizace v autoklávu)

MS media	2,15 g
sacharosa	50 g
Silwett L-77 (surfraktant)	50 µl
BAP (6-benzylaminopurin)	44 nM, přidán sterilně po autoklávování

LB (Luria-Bertani) medium (1 l media, pH 7-7,5, sterilizace v autoklávu)

pepton	10 g
kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
agar	20 g

PBS (1l 20x koncentrovaného roztoku, sterilizace v autoklávu)

KCl	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
NaCl	160 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	43,2 g

PMET (100 ml roztoku, pH 7, sterilizace v autoklávu)

PIPES	1,51g
EGTA	0,19g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05g
TritonX-100	50 µl

PME (100 ml roztoku, pH 7, sterilizace v autoklávu)
PIPES 1,51g
EGTA 0,19g
MgSO₄.7H₂O 0,05g

SOB medium (1 l media, pH 7, sterilizace v autoklávu)
bacto-trypton 20 g
kvasničný extrakt 5 g
NaCl 0,584 g
KCl 0,186 g

SOC medium (1 l media, pH 7, sterilizace v autoklávu)
SOB medium s přidavkem:
MgCl₂ 0,952 g
glucosy 3,603 g

TAE pufr (50x koncentrovaný pufr, sterilizace v autoklávu)
Tris báze 242 g
Ledová kyselina octová 57,1 ml
0,5M EDTA 100 ml

YEB medium (1 l media, pH 7,2, sterilizace v autoklávu)
masový extrakt 5 g
kvasničný extrakt 1 g
pepton 5 g
bacto-agar 18 g
MgSO₄.7H₂O 2 mM

Extrakční pufr (100 ml pufru, pH= 8, sterilizace v autoklávu)
Tris báze 2,423 g
NaCl 1,461 g
EDTA 0,731 g
SDS 0,5 g
doplnit destilovanou vodou na 100 ml

T₁₀E₁ pufr (100 ml pufru, pH=7,6, sterilizace v autoklávu)
Tris báze 0,121 g
EDTA 0,029 g
doplnit destilovanou vodou na 100 ml

Příloha 3 Tabulka vybraných metabolitů pro metabolickou analýzu

Triviální názvy	Systematické názvy	Molekulární hmotnost
české	dle IUPAC	Mr-H
oxazolidine-2-thion	1,3-Oxazolidine-2-thione	72,0450
putrescin	1,4-diaminobutane	87,0922
agmatin	1-(4-aminobutyl)guanidine	87,1048
fumarát	(E)-Butenedioic acid	115,0032
goitrin	5-ethenyl-1,3-oxazolidine-2-thione	128,0170
ornitin	Ornithin	131,0821
tropinon	8-Methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one	138,0919
tropin	(3-endo)-8-Methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol	140,1076
pseudotropin	8-Methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol	140,1076
spermidin	N-(3-Aminopropyl)-1,4-butanediamine	144,1501
kalystegin A5 (A3,A7)	1 alpha, 3 alpha, 4 beta-trihydroxy-nor-tropane	158,0817
arginin	Arginin	173,1039
kaulilexin C	2-(1-methoxyindol-3-yl)acetonitrile	185,0715
arvelexin	2-(4-methoxy-1h-indol-3-yl)acetonitrile	185,0715
kamalexin	3-(1,3-Thiazol-2-yl)-1H-indole	199,0330
spermin	N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine	201,2079
thermospermin	N-{3-[(3-Aminopropyl)amino]propyl}-1,4-butanediamine	201,2079
rapalexin A	3-Isothiocyanato-4-methoxy-1H-indole	203,0279
kyselina sinapová	(2E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)acrylic acid	223,0607
daidzein	7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one	253,0501
kochlearine	8-Methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl 3-hydroxybenzoate	260,1287
kaempferol	3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one	285,0399
feruloyl malát	Butanedioic acid,[[3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-, (E)-	309,0611
sinapoyl malát	(2S)-2-[[[(2E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propenyl]oxy]succinic acid	339,0716

1-O-sinapoyl-β-D-glukóza	1-O-sinapoyl-β-D-glucose	385,1135
glukorapiferin (progoitrin)	1-S-[(1E,3R)-3-Hydroxy-N-(sulfonatooxy)-4-pentenimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranose	388,0372
S-adenosylmethionin	(2S)-2-Amino-4-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]methyl](methyl)sulfonio]butanoat	398,1373
glukoerucin	1-S-[(1Z)-5-(Methylsulfanyl)-N-(sulfooxy)pentanimidoyl]-1-thiohexopyranose	420,0457
glukonasturtiin	1-S-[(1E)-3-Phenyl-N-(sulfooxy)propanimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranose	422,0580
kemferol 3-rhamnosid (afzelin)	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-deoxy-α-L-mannopyranoside	431,0979
glukobrasicin	1-S-[(1Z)-2-(1H-Indol-3-yl)-N-(sulfonatooxy)ethanimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranose	447,0532
kempferol-3-O-glukosid (astragalin)	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl β-D-glucopyranoside	447,0928
kempferol 7-O-glukosid	3,5-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yl β-D-glucopyranoside	447,0928
quercetin-3-O-glukosid	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl L-allopyranoside	463,0877
neoglukobrasicin	1-S-[2-(1-methoxy-1H-indol-3-yl)-N-(sulfonatooxy)ethanimidoyl]-1-thio-beta-D-glucopyranose	477,0638
kempferitrin	3-[(6-Deoxy-α-L-mannopyranosyl)oxy]-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yl 6-deoxy-α-L-mannopyranoside	577,1558
quercetin 3,7-di-O-alfa-L-rhamnopyranosid	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-3-[(2S,3S,5R)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-7-[(2S,4S,5R)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-4-one	593,1507
kempferol-3-O-β-D-glukopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-7-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-4-one	593,1507

diosmin	5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)- 7-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy - 6-[[2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	607,1663	
---------	---	----------	--