

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jana Modráčková

Mechanismy a regulace ukládání kalózy do buněčné stěny

Arabidopsis thaliana

Mechanisms and regulation of callose deposition on the wall of

Arabidopsis thaliana

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Ivan Kulich, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 13.5.2016

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala mému školiteli Mgr. Ivanu Kulichovi, Ph.D. a také Mgr. Zdeňce Vojtíkové za pomoc při tvorbě této bakalářské práce, cenné rady a podporu nejen během čtení vědeckých článků a psaní tohoto textu, ale i při učení se práci a metodám v naší laboratoři.

ABSTRAKT

Kalóza (β -1,3-glukan) je významným polysacharidem rostlinné buněčné stěny, který se účastní mnoha vývojových či stresových reakcí. I přes její důležitost jsou znalosti o příčinách syntézy kalózy, o její regulaci a významu jejího ukládání značně limitované. Díky molekulárním a genetickým metodám byla odhalena rodina kalóza syntáz, které jsou odpovědné za depozici kalózy v různých reakcích a místech rostlinného těla. Tato práce shrnuje znalosti o procesech, kterých se kalóza účastní, a uvádí přehled jednotlivých proteinů rodiny kalóza syntáz včetně jejich fylogenetické analýzy a srovnání podobností s celulóza syntázami se zaměřením se především na modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*.

Klíčová slova: *Arabidopsis thaliana*, β -1,3-glukan, kalóza, kalóza syntáza, polymer buněčné stěny rostlin

ABSTRACT

Callose (β -1,3-glucan) is a significant plant cell wall polysaccharide, which participates in many developmental and stress responses. Despite the importance of this polymer, the knowledge on the causes of callose synthesis, its regulation and the meaning of callose deposition are still limited. The family of callose synthases was revealed thanks to molecular and genetic methods. They are responsible for callose deposition in different reactions and the different spaces of the plant body. This thesis summarizes the knowledge about the processes, in which callose is involved, and it presents an overview of the individual proteins from callose synthase family including their phylogenetic analysis and the comparison with the cellulose synthase focusing on the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, β -1,3-glucan, callose, callose synthase, plant cell wall polymer

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Kalóza	2
2.1	Kalóza ve vývoji pylu a růstu pylové láčky	2
2.2	Kalóza během cytokineze.....	3
2.3	Kalóza v plasmodesmatech	3
2.4	Kalóza v reakcích na biotický a abiotický stres	3
3	Syntéza kalózy	5
3.1	Komplexy kalóza syntáz.....	7
3.2	Regulace aktivity kalóza syntáz	7
3.3	Podobnost se syntézou celulózy	8
3.4	Jednotlivé kalóza syntázy	10
3.4.1	Kalóza syntáza1 (CalS1)	10
3.4.2	Kalóza syntáza3 (CalS3)	11
3.4.3	Kalóza syntáza5 (CalS5)	11
3.4.4	Kalóza syntáza7 (CalS7)	13
3.4.5	Kalóza syntáza9 (CalS9)	14
3.4.6	Kalóza syntáza10 (CalS10)	15
3.4.7	Kalóza syntáza12 (CalS12)	16
3.4.8	Další kalóza syntázy	17
4	Degradace kalózy.....	19
5	Kalóza a těžké kovy	20
5.1	Ukládání kalózy v kořenech vlivem těžkých kovů.....	20
5.2	Reakce kalózy a těžkých kovů v prvoklíčku	21
5.3	Efekty těžkých kovů a kalózy na vývoj pylové tyčinky a klíčení	22
6	Závěr	23
7	Seznam použitých zdrojů.....	25

1 ÚVOD

Kalóza je lineární β -1,3-glukan vyskytující se ve velkém spektru rostlin (vyšších rostlin i řas), navíc strukturně podobný polysacharid se nachází i v bakteriích, kvasinkách, houbách a lišejnících. V rostlinách se kalóza účastní mnoha vývojových a stresových reakcí v různých částech rostlinného těla jakožto reverzibilně odbouratelná složka buněčné stěny a s ní asociovaných struktur. Syntéza kalózy je zajišťována skupinou dvanácti enzymů kalóza syntáz (dále CalS) obsahující několikrát membránou procházející domény, kterými asociují CalS s membránou. Touto terciární strukturou se CalS podobají celulóza syntázám díky čemuž se dříve myslelo, že jsou jedním a tím samým enzymem.

Během vývoje pylu je kalóza nezbytná pro syntézu stěnové exiny a celkovou životaschopnost pylu. Při klíčení a růstu pylové láčky formuje kalózové zátky (septa) napomáhající transportu vegetativního jádra a spermatických buněk. Kalóza je zapojená i během cytokineze v celém rostlinném těle, kdy je esenciální pro tvorbu dočasné buněčné stěny (tzv. buněčné desky), jež zajišťuje rychlou a silnou expanzi během buněčného dělení. V okolí vstupu do plasmodesmat i po celé jejich délce je depozice kalózy zodpovědná za prostorovou a časovou regulaci symplastické permeability zajištěním jejich dočasným zavíráním.

Mechanické a chemické narušení rostliny, fyzický či biotický stres (plazmolýza, změny teplot a mikrobiální infekce) patří mezi procesy, při kterých velmi rychlá depozice kalózy vytváří fyzickou bariéru ochraňující vnitřní prostředí rostlinných tkání. Tato bariéra je také ochranou rostliny proti příjmu těžkých kovů či umožňuje jejich vytěsnění a izolaci z intracelulárního prostoru. Specifická depozice kalózy v trichomech v podobě kroužků na jejich bázi, zajišťující též fyzickou bariéru proti navrácení toxických látek vytěsněných do trichomů, nás přivádí ke studiu kalóza syntáz.

2 KALÓZA

Jak již bylo zmíněno v úvodu kalóza je především rostlinný lineární polysacharid tvořený glukózami pospojovanými β -1,3 vazbami, který se vyskytuje nejen v širokém spektru vyšších rostlin, ale i v řasách (Scherp et al., 2001). Strukturně podobný β -1,3-glukan byl nalezen také v bakteriích, houbách a kvasinkách (Douglas, 1994). Kalóza je produkována rostlinami na různých místech, jakožto komponenta specifické buněčné stěny či komponenta struktur s buněčnou stěnou asociovaných, a dále během různých procesů, ať už vývojových nebo v odpovědi na rozličné abiotické a biotické stresy. Syntézu kalózy provádí kalóza syntázy (CalS) a její degradaci zajišťují β -1,3-glukanázy (Chen and Kim, 2009; Ellinger and Voigt, 2014; Verma and Hong, 2001).

2.1 Kalóza ve vývoji pylu a růstu pylové láčky

Kalóza je zapojena do vývoje pylu nejen jako strukturální komponenta nutná pro syntézu stěnové exiny pylu a pro životaschopnost pylu, ale též je nezbytná i pro normální klíčení pylové láčky a její růst. Tvorby této kalózy se účastní CalS5, CalS9, CalS10, CalS11 a CalS12 (Abercrombie et al., 2011; Nishikawa et al., 2005; Xie et al., 2009).

Ve vyvíjejících se prašnicích mikrosporocyty syntetizují speciální dočasnou stěnu z kalózy mezi primární buněčnou stěnu a plasmatickou membránu. Depozice kalózy pokračuje nadále i během meiotického dělení, kdy nejspíše zabraňuje případnému splývání buněk. A navíc celkově obklopuje mikrosporové tetrády, čímž pravděpodobně vytváří molekulový filtr ochraňující vyvíjející se mikrospory od okolní diploidní tkáně (Dong et al., 2005; Enns et al., 2005; Shi et al., 2015a).

Aktivita kalózy v prašnicích je nízká během první meiosy a rapidně stoupá při ukončení druhého dělení. Nakonec je kalózová stěna degradována a mikrospory jsou vypuštěny do okolí. Předpokládá se, že načasování formace a degradace kalózy je klíčové pro normální vývoj pylu (Dong et al., 2005).

V pylových láčkách je kalóza syntetizována v subapikální oblasti pod primární buněčnou stěnu ve formě tenké vrstvy, která zajišťuje odolnost proti tahovému a tlakovému napětí, a navíc redukuje propustnost stěny a formuje zátky (septa). Tyto kalózové zátky jsou nutné pro zajištění přenosu omezeného množství objemu cytosolu, které je láčka ještě schopná pojmout. Jejich tvorba je periodická a odděluje rostoucí špičku od přenášené

cytoplasmy s vegetativním jádrem a dvěma spermatickými buňkami (Abercrombie et al., 2011; Nishikawa et al., 2005).

2.2 Kalóza během cytokineze

Buněčná deska v centrální rovině mateřské buňky je první známkou nově se tvořící buněčné stěny a její depozice je zahájena fúzí váčků do membránové sítě ve středu fragmoplastu. Jedná se o velmi rychlý proces, během kterého je nutná syntéza velkého množství kalózy, která je právě jednou z hlavních složek formující se buněčné desky. Kalóza ovšem není dopravována ve váčcích, nýbrž se tvoří přímo na buněčné desce pomocí kalóza syntázového komplexu, který je tvořen CalS1 (pravděpodobně je zapojena i CalS9 a CalS10), UDP-glukóza transferázou a fragmoplastinem. Depozice kalózy je následována depozicí a organizací celulózy s dalšími složkami buněčné stěny a současným degradováním kalózy β -1,3-glukanázou. Kalóza tedy hraje esenciální roli v cytokinezi při tvorbě dočasné nascentní buněčné stěny, která je schopná rychlé a silné expanze během cytokineze (Hong et al., 2001a, 2001b; Samuels et al., 1995; Thiele et al., 2009).

2.3 Kalóza v plasmodesmatech

Ve vyšších rostlinách jsou téměř všechny buňky symplasticky propojeny skrze plasmodesmata. Právě zde je potřebná regulace přesunu živin, signálních molekul aj. v odpovědi na vývojové podněty, biotický a abiotický stres. Tato regulace je zajišťována dočasnou depozicí kalózy v okolí vstupu do plasmodesmat i po celé jejich délce. Toto prostorové a časové ovládání symplastické permeability je zajištěno CalS3 (Sevilem et al., 2013; Vatén et al., 2011; Yadav et al., 2014) a CalS10. Uzavírání plasmodesmat pomocí CalS10 navíc hraje spolu s Ca^{2+} a ROS signalizací důležitou roli v auxinem indukované fototropické odpovědi (více viz kap. 3.4.6.) (Han et al., 2014; Jackson, 2015).

2.4 Kalóza v reakcích na biotický a abiotický stres

Kalóza je depozitována i v odpovědi na různé stresy, např. při narušení rostliny mechanicky, chemicky nebo při fyzickém či biotickém stresu jako je plazmolýza, zvýšená či snížená teplota a mikrobiální infekce. V těchto reakcích je kalóza velmi rychle depozitována mezi plasmatickou membránu a buněčnou stěnu za vytvoření fyzické bariéry, jakožto ochranné vrstvy vnitřního prostředí rostlinných tkání zabraňující či zpomalující průnik vnějších patogenních agens. Ve sporofytické tkáni je za tuto depozici zodpovědná CalS12 (PMR4), která vytváří obranné papily (zesílení buněčné stěny v místě napadení patogenem či

poranění). Dalšími geny, které jsou indukované biotickým stresem, jsou CALS1 a CALS6 (Ellinger et al., 2013; Jacobs et al., 2003).

K depozici kalózy dochází i v trichomech a to v podobě kroužku na jejich bázi a charakteristickém tečkovaném vzoru nad kroužkem. Tyto kroužky se tvoří v průběhu zrání trichomů a pravděpodobně zajišťují fyzickou bariéru proti navrácení látek, které jsou deponovány do trichomů (těžké kovy, sekundární metabolity aj.) (Kulich et al., 2015). Za tuto depozici je odpovědná CalS12 (PMR4), kterou na plasmatickou membránu dopravuje podjednotka exocystu EXO70H4. Je tedy zřejmé, že CalS12 se neúčastní pouze odpovědi na patogena, ale i jiných procesů. (Kulich, Vojtková et al., in preparation).

Kalóza vytváří i obrannou fyzickou bariéru proti příjmu těžkých kovů, vytvářením ztluštěniny buněčné stěny především v kořenech, které jsou nejvíce vystavovány kovům obsaženým ve znečištěných půdách. A dále v buňkách, u kterých již došlo k příjmu kovů, vytváří prostor mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou pro jejich možnou depozici z intracelulárního prostoru (Eleftheriou et al., 2011; Kartusch, 2003).

Syntéza kalózy je aktivována i v odpovědi na reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS), které vznikají nejen při vystavení rostliny nadměrnému množství těžkých kovů (Eleftheriou et al., 2011; Jones et al., 2006; Krzesłowska, 2010) a biotickým stresům, jako jsou patogenní nákazy. Při infekcích dochází ke zvýšení hladiny H_2O_2 a jiných ROS, čímž dochází ke zvýšení transkripce CALS následované depozicí kalózy (López-Cruz et al., 2016).

3 SYNTÉZA KALÓZY

Kalóza je syntetizována skupinou dvanácti enzymů kalóza syntáz, pro které se využívá dvojí nomenklatura (viz tab. 1): podle skupiny Desh Verma se nazývají CalS (Callose Synthase) a podle skupiny Somerville GSL (GLUCAN SYNTHASE-LIKE). Většina genů CALS má okolo 40-50 exonů s výjimkou CALS11 a CALS12, které mají pouze 2-3 exony (Chen and Kim, 2009; Verma and Hong, 2001). Geny CALS sdílejí homologii s kvasinkovými geny FKS (FK506 SENSITIVITY), které kódují podjednotky predikovaných (1,3)- β -glukan syntáz (Ellinger and Voigt, 2014).

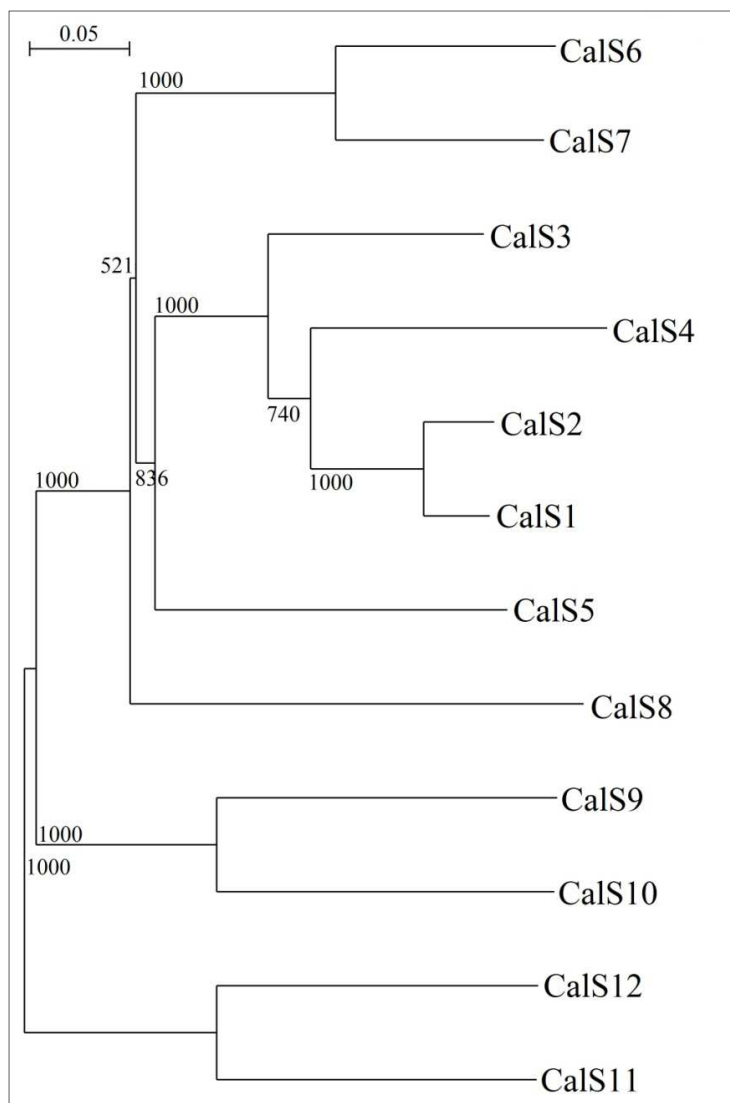
CalS nomenklatura	GSL nomenklatura	AT kód genu
CalS1	GSL6	AT1G05570
CalS2	GSL3	AT2G31960
CalS3	GSL12	AT5G13000
CalS4	GSL9	AT5G36870
CalS5	GSL2	AT2G13680
CalS6	GSL11	AT3G59100
CalS7	GSL7	AT1G06490
CalS8	GSL4	AT3G14570
CalS9	GSL10	AT3G07160
CalS10	GSL8	AT2G36850
CalS11	GSL1	AT4G04970
CalS12 (PMR4)	GSL5	AT4G03550

Tabulka 1: V dostupné literatuře je poněkud zmatek v nomenklatuře kalóza syntáz, a proto zde uvádím již na začátku tuto tabulku existujících názvů CalS a jejich AT kódy genu.

Rodinu kalóza syntáz můžeme podle fylogenetické analýzy rozdělit do několika skupin (viz obr. 1 na další str.). Nejsamostatnější skupinu tvoří CalS11 a CalS12 mající společnou funkci ve vývoji samčího sporofytu a zde jsou vzájemně zastupitelné (Enns et al., 2005). Tyto 2 geny se z rodiny kalóza syntáz vymykají tím, že obsahují pouze 3 introny, zatím co ostatní geny obsahují kolem 50 intronů. CalS11 a CalS12 tedy nejspíše vznikly duplikací genu, který prošel reverzně transkripční událostí. Další oddělená skupina obsahuje CalS9 a CalS10, které se společně vyskytují v pylu, a předpokládá se, že dohromady vytvářejí funkční komplex (Huang et al., 2009). Velkou skupinu tvoří CalS1, CalS2, CalS3, CalS4 a

CalS5, které ovšem nespojuje místně či funkčně specifická lokalizace. Dvojice CalS6 a CalS7 tvoří poslední skupinu a CalS8, jejíž funkce zatím není známá, stojí samostatně.

Většina proteinů CalS má velikosti asi 200 kDa a tvoří je okolo 2000 aminokyselin. CalS je multipodjednotkový enzym asociující s membránou skrze několikrát membránou procházející domény (predikováno je 10 domén, které byly již u osmi CalS potvrzeny), jež jsou rozdělené do N-terminální a C-terminální oblasti, a dále má cytoplasmatickou část vytvářející centrální hydrofilní smyčku. Tato smyčka má katalytickou doménu, která se dělí na dvě vazebné subdomény pro UDP-glukozu a glycosyltransferázu (Hong et al., 2001b). CalS se na místo syntézy (tedy membránu) dostávají nejspíše konvenční sekretorickou dráhou pomocí váčků. Tato teorie je podpořena nalezením CalS5 a CalS12 ve váčkových strukturách (Ellinger et al., 2013; Xie et al., 2012).



Obrázek 1: fylogenetická analýza genů rodiny kalóza syntáz v *Arabidopsis thaliana*. Tento strom byl vytvořen z alignentu aminokyselin vytvořeného skrze MACAW a následného použití programu ClustalW2. Robustnost tohoto stromu byla vyzkoušena využitím různých alignentů (z MCOFFE, TCOFFE a MUSCLE).

Proteiny CalS můžeme rozdělit do skupin podle jejich role v rostlinném těle. První skupina syntetizuje kalózu během vývoje pylu a buněčného dělení: CalS5, CalS9, CalS10 a CalS11. V druhé skupině jsou CalS účastníci se formace fyzické bariéry proti abiotickým a biotickým stresům: CalS3, CalS7 a CalS12. A v poslední skupině jsou CalS u nichž zatím nebyly zjištěny jejich funkce: CalS2, CalS4, CalS6 a CalS8 (více informací o funkcích jednotlivých CalS v rostlinném těle viz kap. 3.4).

3.1 Komplexy kalóza syntáz

CalS existuje jako multi-podjednotkový enzymový komplex v různých rostlinných tkáních. Komplex je tvořen samotnou CalS na jejíž cytosolickou centrální hydrofilní smyčku se navazuje UDP-glukóza transferáza (konkrétně UGT1 v případě CalS1). A na tuto transferázu se dále navazuje Rop1, který je homologní s kvasinkovým Rho proteinem regulujícím syntézu β -1,3 glukanu. Rop1 je možným celkovým regulátorem CalS skrze UGT1, u něhož reguluje přenos substrátu (Hong et al., 2001b). Dalším zúčastněným proteinem je SuSy (Sukróza syntáza), jejíž vazba na membránu je regulovaná fosforylací a předchází samotné biosyntéze kalózy. SuSy produkuje UDP-glukózu, jež je zdrojovým substrátem pro syntézu kalózy, a je dále přenášena díky UGT1 na CalS vytvořeným substrátovým kanálem (Verma, 2001). Rop1 se stává s membránou asociovaným proteinem, kdežto SuSy a UGT1 nemají žádné případné transmembránové domény a interagují tak přímo s hydrofilní smyčkou CalS skrze zatím neurčené specifické interakce (Hong et al., 2001a).

Nejspíše existují další proteiny interagující s CalS komplexem a kontrolují tak jeho aktivitu, např. v odpovědi na abiotický a biotický stres. Jedním z možných proteinů je annexinu podobný protein s GTPázovou aktivitou, který skrze Ca^{2+} signalizaci přepíná syntézu z kalózy na celulózu. Navíc je možné, že různé CalS díky odlišnostem v lokalizaci a funkci mohou vytvářet různé proteinové komplexy (Hong et al., 2001a).

3.2 Regulace aktivity kalóza syntáz

Regulace syntézy kalóz může probíhat na několika úrovních. První z nich je ovlivnění transkripce genů CALS, jejichž transkripční faktory nejsou zatím známe, až na výjimku ARF (Auxin Response Factor). U auxinem indukovaného zavírání plasmodesmat pomocí kalózy reguluje konkrétně ARF7 expresi CALS10. Expres genů CALS5 během formování pylové stěny je regulovaná ARF17 a dále sestřihem pre-mRNA díky CDKG1 (CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1) (Han et al., 2014; Huang et al., 2013; Yang et al., 2013).

Dalším možným způsobem regulace je fosforylace, kdy kináza či fosfatáza, která by byla zodpovědná za post-translační modifikaci CalS, zatím nebyla nalezena. Je pravděpodobné, že se fosforylace vyskytuje u CalS5, CalS9 a u CalS12, která byla nalezena s fosforylací během rozličných experimentů stresových situací rostlin.

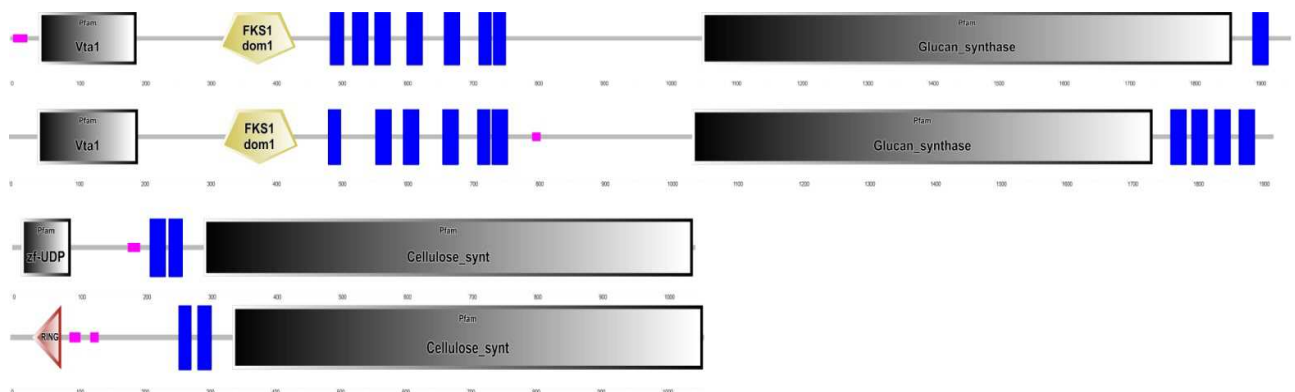
V neposlední řadě jsou enzymatické aktivity běžně regulovány množstvím přijímaného substrátu katalytickým místem či konformační změnou celého komplexu. Tato

regulace se vyskytuje i u CalS a je řízena pomocnými proteiny, které s ní interagují (tj. Rop1, SuSy...) (Ellinger and Voigt, 2014).

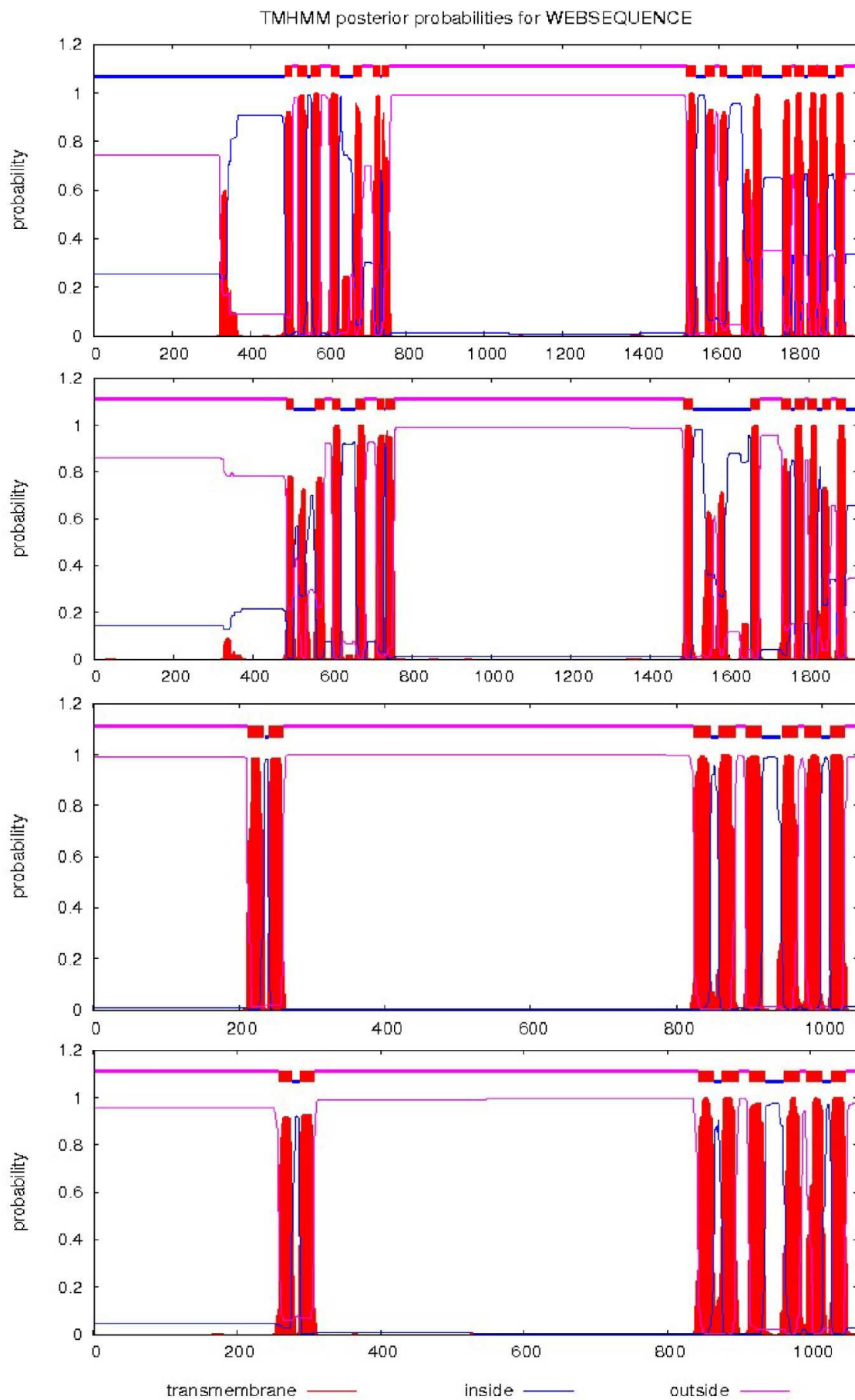
3.3 Podobnost se syntézou celulózy

Dříve se myslelo, že CalS a CelS (celulóza syntáza) jsou jedním a tím samým enzymem (Jacob and Northcote, 1985), ale CalS a CelS jsou od sebe odlišné i přes jejich evoluční příbuznost a sdílení stejné membránové topologie (několik transmembránových domén rozdělených do dvou oblastí s velkou hydrofilní centrální smyčkou v cytoplasmě), která je potřebná pro syntézu a depozici strukturně podobného polymeru. CalS kódují polypeptidy o délce okolo 2000 aminokyselin, což je dvakrát tolik než rostlinné CelS (okolo 1000 aminokyselin) a žádná z CelS se nepodobá primární strukturou aminokyselinové sekvence CalS. Další odlišností je, že komplexy CalS nevytvářejí oproti CelS rosetovou strukturu a jsou nejspíše pouze roztroušené v membráně. Toto zjištění naznačuje, že pro syntézu celulózy je nutné velké množství podjednotek s přesnou organizací v kontrastu k syntéze kalózy (Kudlicka and Brown Jr, 1997; Verma and Hong, 2001).

Grafické znázornění predikce podoby proteinů CalS a CelS (viz obr. 2 a 3) potvrzuje výše zmíněné vlastnosti topologie těchto syntáz. CalS dosahují téměř dvojnásobných délek aminokyselinových sekvencí než CelS, a též počet predikovaných transmembránových domén CalS je dvojnásobný. Podobnost terciárních struktur CalS a CelS vzbuzují domněnku, že terciární struktury jsou evolučně konzervovanější díky selekčnímu tlaku. Z tohoto vyvstává otázka, jestli jsou CalS původnější než CelS (či naopak) nebo jejich podobnost je zapříčiněná evoluční konvergencí.



Obrázek 2: Grafické porovnání struktury proteinů CalS a CelS. Od shora CalS3, CalS5, CelS4 a CelS10. Na tomto obrázku nejsou znázorněny všechny transmembránové domény daných proteinů, jelikož dochází k jejich překrývání s jinými zobrazenými doménami. Pro přesný počet predikovaných transmembránových domén viz obr. 3. Predikce vytvořená z aminokyselinových sekvencí pomocí <http://smart.embl-heidelberg.de/>.



Obrázek 3: Predikce transmembránových domén CaLS a CeLS (od shora CaLS3, CaLS5, CeLS4 a CeLS10). Predikce vytvořená z aminokyselinových sekvencí pomocí TMHMM2 predikce.

3.4 Jednotlivé kalóza syntázy

3.4.1 Kalóza syntáza1 (CalS1)

Kalóza syntáza1 (též známá jako GSL6 – GLUCAN SYNTHASE-LIKE6) je protein tvořený 16 transmembránovými helixy s centrální cytoplasmatickou smyčkou a N-terminální oblastí, který je nezbytný pro stavbu buněčné desky (Hong et al., 2001a; CALS1 callose synthase 1 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI) a je též indukován v odpovědi na patogenní infekci (Dong et al., 2008; Enrique et al., 2011).

Tvorba buněčné desky ve fragmoplastu je rychlý proces, během kterého je nutné deponovat velké množství kalózy v krátkém intervalu. Tento proces je zajištěn CalS komplexem tvořeným CalS1 interagující s dalšími proteiny jako je fragmoplastin [rostlinný dynamin-like protein lokalizovaný podél celé nově formované buněčné desky asociující s exocystovými váčky, které pro ni přinášejí materiál (Gu and Verma, 1996)], UDP-glukosa transferázou (UGT1), Rop1 proteinem a Sukróza syntázou (SuSy) (Hong et al., 2001a). Proteiny UGT1, Rop1 a SuSy neobsahují transmembránové domény, takže v CalS komplexu asociují s membránou po zatím neznámých post-translačních modifikacích či přímou interakcí s CalS1 (Hong et al., 2001b). Kde Rop1 a UGT1 jsou pravděpodobně lokalizovány v centrální hydrofilní doméně CalS1 a vytvářejí zde substrátový kanál pro přenos prekurzorové UDP-glukózy ze SuSy, která tuto glukózu generuje ze sukrózy. Samotný přenos je zprostředkován UGT1 pod regulací Rop1, který je malým GTP vazebným rostlinným Rho-like proteinem, a celkově takto reguluje aktivitu CalS1 (Hong et al., 2001a, 2001b).

Rostlinní jedinci *Citrus limon*, u kterých byla umlčena genová exprese CalS1 pomocí RNA interference, vykazují odlišnou morfologii fenotypu (celkově menší vzrůst a drobnější zvláště listy) a organizaci buněk na histologické úrovni (rozdílná buněčná stěna dceřiných buněk způsobená změnou kompozice buněčné desky v mateřské buňce kvůli odlišné syntéze kalózy). U těchto rostlin tak dochází k narušení fyzické bariéry vůči penetraci patogenů (Enrique et al., 2011). Právě tato patogenní penetrace indukuje expresi NPR1 genu skrze kyselinu salicylovou, jenž interaguje s WRKY transkripčními faktory. Tyto faktory se vážou na *W-box cis*-elementy v promotoru CalS1 u *Arabidopsis thaliana* a zvyšují množství CalS1 v napadené buňce a tak i její rezistenci vůči patogenům (Dong et al., 2008).

3.4.2 Kalóza syntáza3 (CalS3)

Protein Kalóza syntáza3 se též nazývá GSL12 (GLUCAN SYNTHASE-LIKE12) a jeho hlavní funkcí je syntéza kalózy v buněčné stěně obklopující plasmodesmata (Vatén et al., 2011; Yadav et al., 2014). Geny CALS3 jsou také exprimovány v kořenech na plasmatické membráně, kde se účastní vývoje rostliny (Yadav et al., 2014; GSL12 callose synthase 3 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI), dále ve floému stéle a v meristématické tkáni v okolí niky kmenových buněk (Sevilem et al., 2013; Vatén et al., 2011). Ani u této CalS není výjimkou, že se účastní obranných reakcí (Fu et al., 2014).

Jak je výše zmíněno, CalS3 vratně ukládá kalózu v okolí vstupu do plasmodesmat a také podél celých kanálků, čímž místně a časově reguluje průchodnost plasmodesmat pro makromolekuly (především proteiny) ale i miRNA, mezi buňkami a rostlinnými tkáněmi změnou SEL (size exclusion limit) či kompletním uzavřením kanálu (Sevilem et al., 2013; Vatén et al., 2011; Yadav et al., 2014). Ke studiu těchto činností se využívá mutací v genech CalS3, kdy získané mutace CalS3 vedou ke zvýšení akumulace kalózy v plasmodesmatech, tím ke snížení jejich propustnosti. Též je akumulace vyšší i v buněčné stěně v okolí plasmodesmat a navíc dochází k defektům ve vývoji kořene a samozřejmě omezení mezibuněčného transportu. Díky těmto pozorováním bylo zjištěno, že aktivita CalS3 je nejspíše pod kontrolou negativního regulátoru (Vatén et al., 2011).

Dalším nástrojem studia je icals3m, což je tkáňově specifický indukovatelný vektorový systém umožňující overexpresi mutovaných CALS3 genů. icals3m systém aktivuje transgenní gen, čímž dojde k zvýšené produkci kalózy ve specifických tkáních vedoucí k redukci průchodnosti plasmodesmat. Je to tedy velmi efektivní inhibitor symplastického transportu (proteinů i miRNA) (Sevilem et al., 2013). Aktivita icals3m vede k ukončení dělení buněk v kořenovém meristému doprovázenému zvětšením zóny buněčné diferenciace (Vatén et al., 2011).

V obranných reakcích rostlin na patogenní invazi dochází ke zvýšení exprese CalS3 spolu s CalS5 a CalS9 a následnému zavírání pórů sítkových políček v buňkách floému. Celkově je tento proces regulován ethylenovou signální drahou (Fu et al., 2014).

3.4.3 Kalóza syntáza5 (CalS5)

Enzym Kalóza syntáza5 (GSL2 - GLUCAN SYNTHASE-LIKE2) je nezbytný pro syntézu kalózy při vývoji pylu a jeho láčky (Dong et al., 2005; Nishikawa et al., 2005). Jako

mnohé z CalS i CalS5 je tvořená několika transmembránovými doménami s N-terminální oblastí a velkou centrální hydrofilní cytoplasmatickou smyčkou, která interaguje s dalšími komponenty Kalóza syntázového komplexu (Dong et al., 2005). CalS5 byla nalezena nejen na plasmatické membráně jako aktivní forma, ale i v Golgi-endomembránovém systému, kde je inaktivní a nesyntetizuje tak zde žádnou kalózu (Xie et al., 2012).

CALS5 je esenciální pro vývoj pylu vedoucí k samčí fertilitě a nemůže být nahrazena jinou CalS (v prašnicích se nacházejí i CalS9, CalS10, CalS11 a CalS12), nejspíše protože jsou exprimovány v menším množství (Dong et al., 2005). Úlohou CalS5 je formování exiny ve stěně pylu, kde zabraňuje vrstvou kalózy okolo mateřských buněk jejich fúzi, a zároveň tím odděluje vyvíjející se mikrospóry. Dále dochází k syntéze kalózy díky CalS5 v láčkách pylu, jak ve stěně tak v kalózových zátkách, které segmentují rostoucí láčku (Dong et al., 2005; Nishikawa et al., 2005).

Regulace exprese CALS5 se účastní několik genů na různých úrovních. Např. RPG1 je transportérem cukru lokalizovaným na membráně mateřských buněk mikrospor (transportuje zde cukrové podjednotky pro syntézu primexinových prekurzorů a kalózy během meiosis a tetradové fáze) a jeho geny upstream od CALS5 ovlivňují její expresi skrze dostupnost substrátu (Sun et al., 2013). Geny NPU (NO PRIMEXINE AND PLASMA MEMBRANE UNDULATION) kódující zatím neznámý membránový protein, snižují expresi CALS5 a tak i syntézu kalózy, stejně tak jako primexinovou depozici (Chang et al., 2012). Další regulační faktor ARF17 (AUXIN RESPONSE FACTOR17) se váže přímo na promotor CALS5 v AuxRE místě a snižuje expresi těchto genů při formaci primexinu (Yang et al., 2013). Exprese samotného ARF17 je navíc regulována AtTTP (gen ze zinc finger rodiny) skrze miRNA160. V AtTTP over-exprimujících liniích dochází ke zvýšení miRNA160 a tím ke snížení exprese ARF17 a menší syntéze kalózy díky CalS5 ve stěnách pylu (Shi et al., 2015b). Pro transkripci nejen CALS5, ale i dalších genů nutných pro vývoj prašníku je potřebný též gen LFR (Wang et al., 2012). Abnormální depozice kalózy během microsporogeneze a s tím související posunutí „male germ unit“ v pylových zrnech byla zjištěna i při expresi genů CALS5 pod promotorem CaMV35S (Xie et al., 2009).

V regulaci CalS5 na úrovni sestřihu pre-mRNA je známá CDKG1 (CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1) asociující se splicesomem U1 snRNP skrze RSZ33, čímž dochází ke stabilizaci splicesomu na pre-mRNA. CDKG1 takto usnadňuje sestřih šestého

intronu CalS5 v meicytech, pylových tetradách, microsporách a při zrání pylu, kdy dochází k největšímu exprimování CalS5 (Huang et al., 2013).

Co se týká evoluce CalS5, tak byla nejspíše u distálních předků krytosemenných rostlin lokalizována v protoplastu zralého pylu, odkud se pravděpodobně evolučně rozšířila do mladých pylových láček. Tato teorie je podpořena zjištěním, že *Ginko* a *Gnetum* exprimují v pylu orthology CalS5 (homologie kalózové stěny a zátek u nahosemenných a u kvetoucích rostlin). *Pinus taeda* netranskribuje CalS5, ale místo toho se u ní vyskytuje jiná CalS a to PtCalS13 (Abercrombie et al., 2011).

3.4.4 Kalóza syntáza7 (CalS7)

Gen Kalóza syntázy7 (též známá jako *GSL7* – *GLUCAN SYNTHASE-LIKE7*) je specificky exprimován ve floému vodivých pletiv. Predikce ukazují, že CalS7 má oproti dalším CalS dvě transmembránové domény navíc (tedy celkově 18 transmembránových domén). Tyto dvě unikátní domény jsou lokalizované na N-terminální oblasti a nejspíše se účastní cílování CalS7 do výjimečné subcelulární lokalizace, viz dále (Xie and Hong, 2011; Xie et al., 2011).

V nenarušených rostlinách se CalS7 účastní zrání floému, kde je zodpovědná za depozici kalózy během vývoje sítkových desek a je zde důležitá i při formaci jejich pórů. Další syntéza kalózy CalS7 již ve zralém floému je vyvolána poškozením rostliny. Tato depozice se objevuje ve velmi krátkém čase a je požadována pro rychlé uzavření pórů sítkových desek (Barratt et al., 2011; Vatén et al., 2011; Xie et al., 2011; *GSL07 callose synthase 7 [Arabidopsis thaliana (thale cress)]* – Gene –NCBI).

Kalóza je v sítkových deskách esenciální pro normální floémový transport, proto v mutantech *cals7* dochází k velkému snížení transportu sacharózy ztrátou kalózy ze sítkových desek, které vede k drastické redukci vodivosti floému (Barratt et al., 2011).

Podobně jako u CalS1 i CalS7 formuje komplex s dalšími proteiny jako je SuSy5 a SuSy6 (Sukrosa syntáza), které jsou zapojené v biosyntéze kalózy ve floému. Tento komplex se klene plasmatickou membránou sítkových elementů a připojuje se do buněčné stěny. Zajímavé na CalS7 je, že přijímá substrát z buněčného cytosolu a syntetizuje kalózu ven z buňky (Barratt et al., 2011; Xie and Hong, 2011).

3.4.5 Kalóza syntáza9 (CalS9)

CalS9 (GSL10 – GLUCAN SYNTHASE-LIKE10) je protein mající transmembránové domény na obou koncích proteinu, které jsou cílované do plasmatické membrány, a hlavní katalytickou podjednotku v cytosolu, na níž se navazují další proteiny vytvářející s CalS9 funkční komplex (tj. UDP-glukoza transferáza, Rho GTPáza a protein kináza) (Huang et al., 2009). CalS9 je nezbytná v gametofytické fázi rostliny pro vývoj pylu, správný růst pylové láčky a kontrolu načasování klíčení, ale zároveň je exprese genů této kalóza syntázy nutná i ve sporofytické fázi pro normální růst rostliny (Abercrombie et al., 2011; Huang et al., 2009; Töller et al., 2008; Xie et al., 2009; GSL10 callose synthase 9 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI).

Funkce CalS9 při vývoji pylu je odlišná od pozorované role CalS5, která se účastní vývoje mikrospor a formace exiny. CalS9 zatím neznámými mechanismy reguluje vstup polarizovaných mikrospor do první a druhé pylové mitosy, kdy je cílena na buněčnou desku. Tento proces probíhá nezávisle na CalS10 i přes jejich velkou homologii a společnou expresi v pylu. Ovšem nedá se vyloučit, že CalS9 a CalS10 spolupracují jako proteinový komplex (Huang et al., 2009; Töller et al., 2008; Xie et al., 2009). Homozygotní mutanti *cals9* jsou letální, jelikož dochází ke sterilitě samčího gametofytu. Sterilita je způsobena smrtí mikrospor kvůli defektní cytokinezi, během které je právě kalóza zapojena při upevnování tubulární sítě na nově se formující buněčnou desku. K depozici kalózy dochází i v mutantních rostlinách, ale ve špatných místech a v abnormálních strukturách. CalS9 sice není esenciální pro tuto depozici, ale pravděpodobně je potřebná pro kontrolu správného načasování a umístění syntetizované kalózy (Töller et al., 2008). Zajímavé je, že funkce CalS9 není nahraditelná žádnou z dalších CalS, které jsou též exprimovány během vývoje pylu (tj. CalS2, CalS5, CalS10 a CalS12) (Huang et al., 2009).

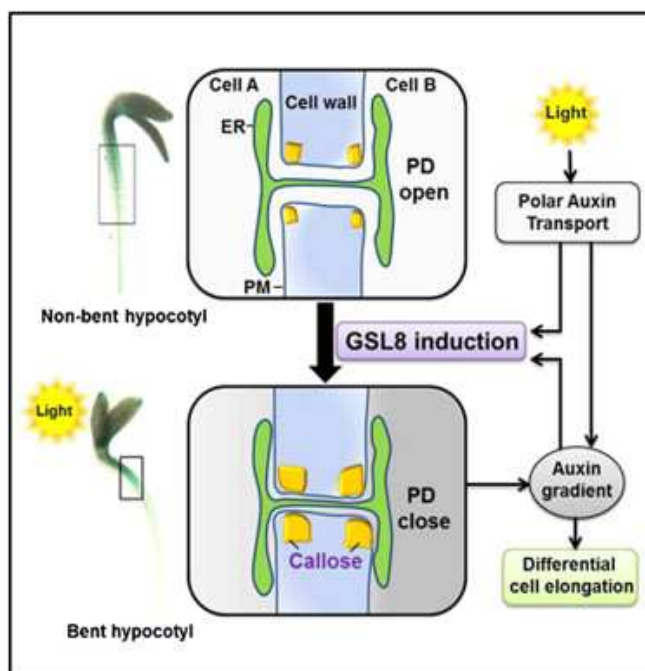
Předpokládá se, že CalS9 nemá vliv na vývoj samičího gametofytu, díky úspěšnému naklonování heterozygotních mutantních jedinců *cals9*. Vajíčka těchto rostlin jsou plodná, produkují normální embrya a semena, čímž přecházejí mutantní alely *cals9* do potomstva skrze samičí gametofyt (Huang et al., 2009).

Vliv genů CALS9 na sporofytickou fázi rostliny není zatím přesně známý. Podle dosavadních znalostí nejspíše dochází k defektu cytokineze a mitosy. Umlčení transkripce CALS9 vede k fenotypu trpasličího vzrůstu daných rostlinných jedinců (Abercrombie et al., 2011; Töller et al., 2008).

3.4.6 Kalóza syntáza10 (CalS10)

Protein Kalóza syntáza10 se jinak nazývá GSL8 (GLUKAN SYNTHASE-LIKE8) a hraje důležitou roli v regulaci propustnosti plasmodesmat, také je zapojen do vývoje pylu, účastní se formace buněčné desky, cytokineze a údržby ploidie genomu ve všech stádiích vývoje rostlin (De Storme et al., 2013; Ellinger and Voigt, 2014; Han et al., 2014; Huang et al., 2009; Töller et al., 2008; GSL8 glucan synthase-like 8 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI). Další funkci zaujímá během organizace průduchových buněk a vývoje epidermis (Chen et al., 2009; Guseman et al., 2010).

Jak je zmíněno výše, CalS10 reguluje depozicí kalózy symplastickou permeabilitu, tedy propustnost plasmodesmat. Díky této regulaci dochází v rostlině k stanovení gradientu auxinu, který sám ovlivňuje expresi CALS10. A to tak, že zvýšenou hladinou auxinu dochází skrze ARF7 (Auxin Response Factor7), jenž má vazebné místo v promotru CALS10, k indukci exprese tohoto genu, a tím se následně uzavírají plasmodesmata kalózou. Tato reakce je fototropickou odpovědí, tudíž světlem stimulovaná skrze DR5 auxinovou reakci, která se objevuje



Obrázek 4: Fototropická regulace propustnosti plasmodesmat kalózou (Han et al., 2014)

nejvíce v epidermis a kortexu, kde se lokalizuje PHOT1 fotoreceptor. Regulace depozice kalózy v plasmodesmatech může nejspíše probíhat i díky dalším impulzům aktivovaných auxinem než pouze DR5 odpovědí. A to například zvýšením exprese kalóza syntázy díky Ca^{2+} , který může být vylákán z extracelulárních zásob auxinem na jeho přechodně zvýšenou cytosolickou hladinu, či auxinem zvýšené produkci ROS. Oba tyto faktory (Ca^{2+} a ROS) totiž pozitivně stimulují syntézu kalózy v rostlinných buňkách (Han et al., 2014; Jackson, 2015).

CalS10 se spolu s CalS9 vyskytuje i v pylu, kde se dá předpokládat, že i přes své nezávislé role vytvářejí funkční komplex (Huang et al., 2009). Ve vývoji samčího gametofytu jsou oba dva proteiny potřebné pro vstup polarizovaných mikrospor do mitosy, jejíž narušení vede ke změně ploidie a vznikají 2n gametické formace (De Storme et al., 2013). A zároveň mají tyto kalóza syntázy roli i ve vývoji sporofytu, kde jsou potřebné pro normální růst

rostliny. Pro tyto procesy je společným dějem cytokineze, ve které se projevují defekty u mutantních jedinců *cals9* a *cals10*, kdy nedochází k vstupu mikrospor do mitosy u vývoje pylu a u celkového růstu rostliny se vyskytuje fenotyp trpasličího vzrůstu kvůli narušení depozice kalózy do buněčné desky (Chen et al., 2009; Töller et al., 2008).

3.4.7 Kalóza syntáza12 (CalS12)

CalS12 je známá jako GSL5 (GLUCAN SYNTHASE-LIKE5) či více jako PMR4, kterýžto název je odvozen od prokázané odolnosti vůči biotrofním patogenům padlí (Powdery Mildew Resistant). Ovšem odolnost proti bakteriálním nákazám (např. *P. syringae*) či mechanickému poranění se pro tento protein neprokázala, z čehož vyplývá úzké spektrum přirozené imunitní odpovědi vytvářené PMR4 proteinem (Jacobs et al., 2003; Vogel and Somerville, 2000).

CALS12 gen kóduje stresem indukovanou kalóza syntázu, která se účastní depozice kalózy na místech houbové penetrace, čím vytváří efektivní fyzickou bariéru (Eggert et al., 2014; Ellinger et al., 2013). Overexprese této kalóza syntázy způsobuje zvýšenou depozici kalózy nejen v místě průniku hub, ale i na povrchu celulózové stěny v blízkosti invadujícího patogenu a nejspíše uzavírá nanopóry na této buněčné stěně, čímž dochází k prevenci houbové penetrace (Eggert et al., 2014).

Při kompletní rezistenci vůči patogenní penetraci nedochází k aktivaci dráhy kyseliny salicylové (hypersenzitivní odpovědi) ani jasmonátové signální dráhy, jelikož dochází k zastavení houbové penetrace brzy po infekci, a tak není zapotřebí spouštět další rostlinné obranné mechanismy. Právě u *pmr4* mutantů došlo k vyvolání těchto drah, z čehož se dá usuzovat, že PMR4 nemá pouze enzymatickou funkci ale nejspíše i regulační, konkrétně jako negativní regulátor dráhy kyseliny salicylové (Ellinger et al., 2013; Huibers et al., 2013; Wawrzynska et al., 2010).

Při umlčení PMR4 dochází po napadení rostliny ke konstitutivní aktivaci obrany kyselinou salicylovou, čímž vznikají nové budoucí možnosti křížení rostlin skrze mutace těchto genů pro zvýšení jejich odolnosti vůči houbovým nákazám. Orthology PMR4 genů byly totiž nalezeny i u jiných rostlin (než pouze u *Arabidopsis thaliana*) jako např. u rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) (Huibers et al., 2013).

CalS12 byla nalezena i v prašnicích (v tapetu, mikrosporách a ve zralém pylu). Spolu s CalS11 je zde nezbytná pro vývoj sporofytu a samčí fertilitu, přičemž CalS12 má nejspíše

důležitější roli ve zrání samčího gametofytu než CalS11. Funkcí CalS12 je formace kalózové stěny oddělující tetraspory a dále se účastní cytokineze mikrogamet, kdy depozituje kalózu na buněčnou desku a formuje primární buněčnou stěnu mikrospór (Enns et al., 2005; Shi et al., 2015a).

V regulaci CalS12 je zapojena RabA4c GTPáza (též nazývána SMALL MOLECULAR WEIGHT G-PROTEIN1). Je pravděpodobné, že RabA4c funguje podobně jako Rop1 GTPáza v případě CalS1, kdy se vytváří komplex, v kterém Rop1 společně s dalším proteinem (tj. UGT1) tvoří substrátový kanál pro přenos UDP-glukosy, a tím reguluje CalS1 (Hong et al., 2001a, 2001b). Zatím je pouze jisté, že se RabA4c účastní polarizovaného váčkového transportu CalS12 a dalším mechanismem skrze přímou interakci reguluje biosyntézu kalózy. Transkripce je zvýšená superoxidy a peroxidem vodíku (tedy ROS – Reactive Oxygen Species), což je důkazem pro roli RabA4c během stresem indukované syntézy kalózy přímou interakcí s CalS12 (Ellinger et al., 2014).

3.4.8 Další kalóza syntázy

Jednou z mála prozkoumaných kalóza syntáz je CalS2, jinak též nazývaná GSL3 (GLUCAN SYNTHASE-LIKE3). CalS2 byla nalezena na plasmatické membráně, stejně tak jako CalS1 s jejímiž geny sdílí velkou homologii (až 92 % identických aminokyselin) a nelze vyloučit, že jsou tyto dva geny funkčně redundantní (Ellinger and Voigt, 2014; Hong et al., 2001a). Exprese CALS2 byla nalezena v samčích i samičích rostlinných orgánech (konkrétně v prašnicích, pestících a embryích) (Dong et al., 2008) a dále je předpokládána i v apikálním meristému kořenů (Hong et al., 2001a). Ovšem funkce CalS2 jsou zatím stále neznámé.

Dalších méně známá je i CalS4 (GSL9 – GLUCAN SYNTHASE-LIKE9). O této CalS jsou pouze krátké zmínky, že byla nalezena v kořenech (Ellinger and Voigt, 2014), ale další bližší informace o lokalizaci či funkci zatím nejsou známy.

Ani o CalS6, jinak pojmenovaná GSL11 (GLUCAN SYNTHASE-LIKE11), se neví mnoho informací. Exprese CALS6 je indukována v odpovědi na biotický stres (patogenní infekce) a pro modifikaci buněčné stěny (Hong et al., 2001a; Jacobs et al., 2003; Maeda et al., 2014), ale mechanismus jejího působení není zatím znám.

Málo poznanou je i CalS8 (GSL4 - GLUCAN SYNTHASE-LIKE4). K expresi jejích genů dochází při patogenních reakcích, ale bližší specifikace funkce této CalS jsou zatím neznámé (Hong et al., 2001a; Maeda et al., 2014).

Také méně známá je CalS11 (GSL1 - GLUKAN SYNTHASE-LIKE1), která se spolu s CalS12, s kterou je geneticky propojena, účastní mikrosporogeneze a mikrogametogeneze pod řízením Ca^{2+} (Abercrombie et al., 2011; Lu et al., 2014). Oba tyto proteiny formují kalózovou stěnu, která odděluje tetraspory a nejspíše mají i další role v cytokinezy mikrospor. CalS11 je exprimována ve všech rostlinných orgánech a je možné, že se účastní i růstu a vývoje rostliny (Adkar-Purushothama et al., 2015; Enns et al., 2005).

4 DEGRADACE KALÓZY

Enzym β -1,3-glukanáza katalyzuje hydrolýzu β -1,3 vazeb mezi molekulami glukózy a způsobuje tak rozpad polysacharidu kalózy, který je nezbytným funkčním mechanismem mnoha fyziologických procesů rostliny (Levy et al., 2007a). Jednou z těchto funkcí je degradace kalózy během uvolňování mikrospór z tetrad v pylových zrnech (Pirone-Davies et al., 2016; Rhee and Somerville, 1998) a některé glukanázy jsou zapojeny do regulace propustnosti plasmodesmat (Levy et al., 2007a; Ruan et al., 2004).

V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno padesát β -1,3-glukanáz a všechny obsahují N-terminální peptid. C-terminální sekvence je variabilní, ale je charakteristická hydrofobní sekvencí, která nejspíše kóduje transmembránovou doménu zodpovědnou za navázání peptidu na GPI-kotvu (Doxey et al., 2007; Levy et al., 2007b).

5 KALÓZA A TĚŽKÉ KOVY

Velkým environmentálním problémem je narůstající množství těžkých kovů v životním prostředí a to především antropologickou činností. Vůči koncentracím těchto těžkých kovů, které jsou pro živočichy již toxické, si rostliny vytvořily různé mechanismy obrany, jako je jejich izolace či hyperakumulace, navázání na organické kyseliny nebo na složky buněčné stěny. Dalším způsobem tolerování těžkých kovů je zabránění jejich příjmu změnou vlastností buněčné stěny díky depozici pektinových látek nebo jiných sacharidů buněčné stěny. Mezi tyto látky využívané pro lokální ztlustění stěny patří nejčastěji právě kalóza (Eleftheriou et al., 2011; Kartusch, 2003).

5.1 Ukládání kalózy v kořenech vlivem těžkých kovů

Kořeny jsou první orgány rostliny vystavené iontům těžkých kovů. Např. olovo je přijímáno kořeny ve formě rozpustných organicko-kovových komplexů (vazba olova na kyselinu citronovou, fumariovou, mnohé polysacharidy aj.), které vznikají díky snižování pH v rhizosféře produkcí protonů a jiných metabolitů kořeny. Samozřejmě je příjem těžkých kovů závislý i na stavu kořenů, přítomnosti jiných organismů, jenž určují distribuci kovů v půdě, i přítomnosti jiných těžkých kovů, které navzájem snižují či zvyšují své příjmy rostlinou, a v neposlední řadě i samotným druhem rostliny (Fahr et al., 2013).

Kalóza, která je rostlinou depozitována mezi plasmatickou membránu a buněčnou stěnu, slouží jako mechanická bariéra proti vstupu kovu a snižuje tak jeho koncentraci v kořenu rostliny (Fahr et al., 2013). Touto depozicí dochází i k vytvoření cílového místa pro sekretování kovů, které již pronikly do rostliny a jsou odstraňovány z cytoplazmy. Zde je daný kov vrstvou kalózy zadržován před zpětným navrácením do protoplastu (Deng et al., 2006; Krzesłowska, 2010). K akumulaci kalózy dochází i v plasmodesmatech, v kterých jakožto strukturní komponenta reguluje intracelulární výměnu iontů a molekul změnou SEL (size exclusion limit). Při stresu kovy tedy kalóza takto inhibuje transport mezi buňkami (Krzesłowska, 2010).

Míra syntézy kalózy kalóza syntázami koreluje s aktivitou β -1,3-glukanázy a společnými mechanismy dochází ke kontrole jejich činnosti. Objevují se různé souvislosti mezi zvýšenou depozicí kalózy a snížením aktivity glukanázy po vystavení rostlin těžkým kovům (Piršelová et al., 2012).

Regulace syntézy kalózy v odpovědi na těžké kovy je zprostředkovaná především skrze Ca^{2+} signalizaci. Při rozrušení vápníkové homeostaze buňky (pomocí signální kaskády fosfolipázy a IP3) dochází k aktivaci CalS za poklesu Ca^{2+} pod kritický práh (Kartusch, 2003). Další regulace depozice kalózy probíhá prostřednictvím ROS, které se generují jako toxická změna v rostlinách vystavených nadměrnému množství těžkých kovů. Samotné ROS vedou ke zvyšování cytoplasmatického Ca^{2+} , a tak k aktivaci CalS (Eleftheriou et al., 2011; Jones et al., 2006; Krzesłowska, 2010). Ovšem stále není jisté, jestli je pro všechny kovy společný model mechanismů vyvolání depozice kalózy. Navíc se tyto mechanismy mohou lišit i u jednotlivých rostlin.

Např. v kukuřici a sóji pozorujeme depozici kalózy v podobě samostatných či skupinových okrsků v buněčných stěnách epidermis, kortexu a endodermis kořenů ošetřených kadmíem či arsenem. Ale při nízké koncentraci olova se neobjevuje žádná kalózová usazenina zřejmě kvůli jeho nízké toxicitě (Piršelová et al., 2012). V reakci na chrom je depozice kalózy zvýšená v rychle se dělících meristemických buňkách kořene a objevuje se v pruzích orientovaných příčně na podélnou osu kořene v nově formovaných buněčných stěnách a střední lamele meristemických buněk (u *Allium cepa*, *Vicia faba* a *Arabidopsis thaliana*). Díky difuzi stěnami buněk meristemické zóny dochází k depozici početných kalózových granulí o různých velikostech i do elongační zóny (Eleftheriou et al., 2011). V rostlině *Allium cepa* dochází k největší akumulaci kalózy při vystavení mědi, kdy se vytváří depozice v epidermálních buňkách kořene ve formě jednotlivých kulovitých lokalizací či jejich seskupení, nebo vznikají zvrásněné konformace pevně připojené na buněčnou stěnu (Kartusch, 2003).

5.2 Reakce kalózy a těžkých kovů v prvoklíčku

Kalóza je v prvoklíčcích běžně přítomna v příčných buněčných stěnách a při vystavení těžkým kovům dochází k syntéze kalózy ve velkém množství i v některých buňkách jako širší či tenčí vrstva ve vnější ale i vnitřní části ztlustěnin buněčných stěn. Ve ztlustěninách kalóza s lipidovými látkami, pektiny aj. vytváří fyzickou bariéru před penetrací iontů kovů do protoplastu (Krzesłowska et al., 2009).

Kov, který již prostoupil do protoplastu, je transportován endocytickou cestou skrze buňky pomocí vezikulárního transportu. Náklady vezikul společně s kovem se akumulují přímo pod buněčnou stěnu rostoucích kořenových špiček. Zde se poté vytváří ztlustěнина buněčné stěny, jakožto místo akumulace kovu oddělené kalózovou vrstvou od protoplastu.

Kalózová vrstva se v těchto ztluštěninách objevuje právě a jen ze strany protoplastu. Ovšem v některých místech depozice kovů, tzv. „cell wall pocket“, kalóza obklopuje uložený kov kompletně ze všech stran a dochází k jejich společnému kotvení do buněčné stěny (Krzyszowska, 2010).

5.3 Efekty těžkých kovů a kalózy na vývoj pylové tyčinky a klíčení

Těžké kovy mají vliv i na rozmnožovací orgány rostlin a to například u rostlin akumulujících velké množství kovu. Mezi projevy těžkých kovů u těchto rostlin mj. patří vytváření kalózových ztluštěnin stěn mateřských buněk mikrospor. Tento jev je považován za bariéru proti penetraci kovů až k samotným pylovým zrnům (Yousefi et al., 2011).

Dalším projevem kovů je snížení schopnosti růstu pylových láček. Při vystavení aktivovaných pylových zrn niklu dochází k abnormální depozici kalózy do iniciál apexu pylových láček. Tato depozice spolu s rozrušením vápníkové homeostázy vede k blokování polárního růstu láčky (Breygina et al., 2012). Po ošetření trivalentním chromem v mladších láčkách vytváří kalóza anomální tečkovaný vzor až do apexu, díky čemuž dochází k abnormálnímu růstu pylové láčky (Speranza et al., 2009). A u jehličnanu ošetřeného olovem je kalóza depozitována navíc ve velkém množství také do špiček láček pylu a snižuje tak účinnost splývání sekretorických váčků s plasmatickou membránou, na kterém je růst láčky závislý (Sheng et al., 2012).

6 ZÁVĚR

Bližší poznání kalózy a její syntézy je důležité nejen pro čistě vědecké účely, ale i pro budoucí využití ve šlechtění rostlin. Díky hlubšímu porozumění depozici kalózy během obrany proti patogenům by bylo možné vyšlechtit odolnější rostliny, a tím zvýšit jejich produktivitu. Též by se dalo využít znalostí o kalóze a jejích reakcí v odpovědi na těžké kovy u rostlin, které jsou schopné je akumulovat, k detoxifikaci především antropologickou činností zamořených půd.

Zajímavým poznatkem o kalóze je její schopnost reverzibilního ukládání jako polysacharidu rostlinné buněčné stěny. Je možné, že jakožto specificky prostorově a časově syntetizovaný polymer (např. během cytokineze na buněčné desce) s pozdějším aktivním odbouráváním může kalóza fungovat jako teoretické dočasné lešení pro tvorbu pevné struktury buněčné stěny dalšími jejími komponenty. Též je možné, že kalóza vytváří pouze nutnou flexibilitu a odolnost nascentní buněčné stěny během vývojových procesů rostlin, kdy jsou tyto vlastnosti nezbytné.

U některých CalS neznáme bohužel zatím blíže jejich funkce (konkrétně CalS2, CalS4, CalS6 a CalS8), dokonce je možné, že jsou v rostlinném těle zapojené do jiných procesů než pouze vytváření kalózy. A dá se předpokládat, že CalS2 sdílí funkční redundanci s CalS1 díky jejich rozsáhlé genové homologii a společnému místu výskytu v procesech rostlinného těla. Podobně i CalS11 je funkčně redundantní s CalS12 a vytvářejí spolu kalózu během vývoje pylu, kdy CalS12 má nejspíše důležitější roli než CalS11. Zajímavé poznání o CalS12 je, že při jejích mutacích v rostlinných jedincích nedochází k vytváření kalózy, i přes výskyt ostatních sporofytických CalS a předpoklad, že některé CalS dokážou nahradit funkci jiných prostorově a funkčně příbuzných kalóza syntáz. Podobně lze pozorovat defekt mutanta *cals10* v mikrosporogenezi, i přes současnou expresi CALS9. Existují zde spekulace o multiproteinových komplexech kalóza syntáz, jak je obdobně známé u celulóza syntáz. Tento scénář je však málo pravděpodobný, jelikož samotná overxpresse iCALS3 (viz kap. 3.4.2) je dostatečná pro indukci nadprodukce kalózy.

Otázka funkční podobnosti CalS tak zůstává jen málo probádaná. Pro jednoznačnou odpověď bych navrhla experiment, u kterého bychom pod promotor kalóza syntázy CalS12 zaklonovali kódující sekvence ostatních kalóza syntáz. Tyto konstrukty by pak byly použity pro komplementaci *cals12* mutanta. O těch, které by potlačili fenotypový projev *cals12* bychom pak mohli říci, že jde o jednu funkční skupinu proteinů. Je však potřeba vzít do

úvahy skutečnost, že kalóza syntázy jsou jedny z nejdelších genů v rostlinách a obsahují kolem 50 intronů, což představuje velkou komplikaci v přípravě konstruktů i možnou příčinu, proč je literatura tak chudá na fluorescenčně značené kalóza syntázy. V době svého bakalářského studia jsem se podílela na přípravě klonování CalS9, CalS12 a přípravě GFP fúzních konstruktů. Jejich charakterizací a sledováním jejich dopravy na plasmatickou membránu se budu zabývat dále ve své diplomové práci.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

Abercrombie, J.M., O'Meara, B.C., Moffatt, A.R., and Williams, J.H. (2011). Developmental evolution of flowering plant pollen tube cell walls: callose synthase (CalS) gene expression patterns. *EvoDevo* 2, 14.

Adkar-Purushothama, C.R., Brosseau, C., Giguère, T., Sano, T., Moffett, P., and Perreault, J.-P. (2015). Small RNA Derived from the Virulence Modulating Region of the Potato spindle tuber viroid Silences callose synthase Genes of Tomato Plants[OPEN]. *Plant Cell* 27, 2178–2194.

Barratt, D.H.P., Kölling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., Zeeman, S.C., and Smith, A.M. (2011). Callose Synthase *GSL7* Is Necessary for Normal Phloem Transport and Inflorescence Growth in *Arabidopsis*[W][OA]. *Plant Physiol.* 155, 328–341.

Breygina, M., Matveyeva, N., Polevova, S., Meychik, N., Nikolaeva, Y., Mamaeva, A., and Yermakov, I. (2012). Ni(2+) effects on *Nicotiana tabacum* L. pollen germination and pollen tube growth. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 25, 1221–1233.

Chang, H.-S., Zhang, C., Chang, Y.-H., Zhu, J., Xu, X.-F., Shi, Z.-H., Zhang, X.-L., Xu, L., Huang, H., Zhang, S., et al. (2012). NO PRIMEXINE AND PLASMA MEMBRANE UNDULATION Is Essential for Primexine Deposition and Plasma Membrane Undulation during Microsporogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 158, 264–272.

Chen, X.-Y., and Kim, J.-Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 489–492.

Chen, X.-Y., Liu, L., Lee, E., Han, X., Rim, Y., Chu, H., Kim, S.-W., Sack, F., and Kim, J.-Y. (2009). The *Arabidopsis* Callose Synthase Gene *GSL8* Is Required for Cytokinesis and Cell Patterning. *Plant Physiol.* 150, 105–113.

De Storme, N., De Schrijver, J., Van Criekinge, W., Wewer, V., Dörmann, P., and Geelen, D. (2013). *GLUCAN SYNTHASE-LIKE8* and *STEROL METHYLTRANSFERASE2* Are Required for Ploidy Consistency of the Sexual Reproduction System in *Arabidopsis*[C][W][OA]. *Plant Cell* 25, 387–403.

Deng, W., Luo, K., Li, D., Zheng, X., Wei, X., Smith, W., Thammina, C., Lu, L., Li, Y., and Pei, Y. (2006). Overexpression of an *Arabidopsis* magnesium transport gene, *AtMGT1*, in *Nicotiana benthamiana* confers Al tolerance. *J. Exp. Bot.* 57, 4235–4243.

Dong, X., Hong, Z., Sivaramakrishnan, M., Mahfouz, M., and Verma, D.P.S. (2005). Callose synthase (*CalS5*) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42, 315–328.

Dong, X., Hong, Z., Chatterjee, J., Kim, S., and Verma, D.P.S. (2008). Expression of callose synthase genes and its connection with *Npr1* signaling pathway during pathogen infection. *Planta* 229, 87–98.

Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, et al. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 12907 – 12911.

- Doxey, A.C., Yaish, M.W.F., Moffatt, B.A., Griffith, M., and McConkey, B.J. (2007). Functional Divergence in the Arabidopsis β -1,3-Glucanase Gene Family Inferred by Phylogenetic Reconstruction of Expression States. *Mol. Biol. Evol.* *24*, 1045–1055.
- Eggert, D., Naumann, M., Reimer, R., and Voigt, C.A. (2014). Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. *Sci. Rep.* *4*.
- Eleftheriou, E.P., Adamakis, I.-D.S., and Melissa, P. (2011). Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma* *249*, 401–416.
- Ellinger, D., and Voigt, C.A. (2014). Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Ann. Bot.* *114*, 1349–1358.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S.C., and Voigt, C.A. (2013). Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in Arabidopsis1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* *161*, 1433–1444.
- Ellinger, D., Glöckner, A., Koch, J., Naumann, M., Stürtz, V., Schütt, K., Manisseri, C., Somerville, S.C., and Voigt, C.A. (2014). Interaction of the Arabidopsis GTPase RabA4c with Its Effector PMR4 Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew[C][W][OPEN]. *Plant Cell* *26*, 3185–3200.
- Enns, L.C., Kanaoka, M.M., Torii, K.U., Comai, L., Okada, K., and Cleland, R.E. (2005). Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Mol. Biol.* *58*, 333–349.
- Enrique, R., Siciliano, F., Favaro, M.A., Gerhardt, N., Roeschlin, R., Rigano, L., Sendin, L., Castagnaro, A., Vojnov, A., and Marano, M.R. (2011). Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Biotechnol. J.* *9*, 394–407.
- Fahr, M., Laplaze, L., Bendaou, N., Hocher, V., Mzibri, M.E., Bogusz, D., and Smouni, A. (2013). Effect of lead on root growth. *Front. Plant Sci.* *4*.
- Fu, M., Xu, M., Zhou, T., Wang, D., Tian, S., Han, L., Dong, H., and Zhang, C. (2014). Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against English grain aphid. *J. Exp. Bot.* *65*, 1439–1453.
- Gu, X., and Verma, D.P. (1996). Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J.* *15*, 695–704.
- Guseman, J.M., Lee, J.S., Bogenschutz, N.L., Peterson, K.M., Virata, R.E., Xie, B., Kanaoka, M.M., Hong, Z., and Torii, K.U. (2010). Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis CHORUS (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8). *Development* *137*, 1731–1741.
- Han, X., Hyun, T.K., Zhang, M., Kumar, R., Koh, E., Kang, B.-H., Lucas, W.J., and Kim, J.-Y. (2014). Auxin-Callose-Mediated Plasmodesmal Gating Is Essential for Tropic Auxin Gradient Formation and Signaling. *Dev. Cell* *28*, 132–146.

- Hong, Z., Delauney, A.J., and Verma, D.P.S. (2001a). A Cell Plate–Specific Callose Synthase and Its Interaction with Phragmoplastin. *Plant Cell* 13, 755–768.
- Hong, Z., Zhang, Z., Olson, J.M., and Verma, D.P.S. (2001b). A Novel UDP-Glucose Transferase Is Part of the Callose Synthase Complex and Interacts with Phragmoplastin at the Forming Cell Plate. *Plant Cell* 13, 769–779.
- Huang, L., Chen, X.-Y., Rim, Y., Han, X., Cho, W.K., Kim, S.-W., and Kim, J.-Y. (2009). Arabidopsis glucan synthase-like 10 functions in male gametogenesis. *J. Plant Physiol.* 166, 344–352.
- Huang, X.-Y., Niu, J., Sun, M.-X., Zhu, J., Gao, J.-F., Yang, J., Zhou, Q., and Yang, Z.-N. (2013). CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1 Is Associated with the Spliceosome to Regulate CALLOSE SYNTHASE5 Splicing and Pollen Wall Formation in Arabidopsis[C][W][OA]. *Plant Cell* 25, 637–648.
- Huibers, R.P., Loonen, A.E.H.M., Gao, D., Van den Ackerveken, G., Visser, R.G.F., and Bai, Y. (2013). Powdery Mildew Resistance in Tomato by Impairment of SIPMR4 and SIDMR1. *PLoS ONE* 8.
- Jackson, D. (2015). Plasmodesmata spread their influence. *F1000Prime Rep.* 7.
- Jacob, S.R., and Northcote, D.H. (1985). In Vitro Glucan Synthesis by Membranes of Celery Petioles: The Role of the Membrane in Determining the Type of Linkage Formed. *J Cell Sci* 1985, 1–11.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G.B. (2003). An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* 15, 2503–2513.
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., and Gilroy, S. (2006). Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ.* 29, 1309–1318.
- Kartusch, R. (2003). On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma* 220, 219–225.
- Krzyszowska, M. (2010). The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol. Plant.* 33, 35–51.
- Krzyszowska, M., Lenartowska, M., Mellerowicz, E.J., Samardakiewicz, S., and Woźny, A. (2009). Pectinous cell wall thickenings formation—A response of moss protonemata cells to lead. *Environ. Exp. Bot.* 65, 119–131.
- Kudlicka, K., and Brown Jr, R.M. (1997). Cellulose and Callose Biosynthesis in Higher Plants (I. Solubilization and Separation of (1->3)- and (1->4)-[beta]-Glucan Synthase Activities from Mung Bean). *Plant Physiol.* 115, 643–656.
- Kulich, I., Vojtková, Z., Glanc, M., Ortmannová, J., Rasmann, S., and Žárský, V. (2015). Cell Wall Maturation of Arabidopsis Trichomes Is Dependent on Exocyst Subunit EXO70H4 and Involves Callose Deposition. *Plant Physiol.* 168, 120–131.

- Levy, A., Erlanger, M., Rosenthal, M., and Epel, B.L. (2007a). A plasmodesmata-associated β -1,3-glucanase in Arabidopsis. *Plant J.* *49*, 669–682.
- Levy, A., Guenoune-Gelbart, D., and Epel, B.L. (2007b). β -1,3-Glucanases. *Plant Signal. Behav.* *2*, 404–407.
- López-Cruz, J., Crespo-Salvador, Ó., Fernández-Crespo, E., García-Agustín, P., and González-Bosch, C. (2016). Absence of Cu-Zn-superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in Arabidopsis and in tomato plants, which reveals interplay among ROS, callose and signaling pathways: Absence of BCSOD1 alters ROS and fungal virulence in plants. *Mol. Plant Pathol.* n/a-n/a.
- Lu, P., Chai, M., Yang, J., Ning, G., Wang, G., and Ma, H. (2014). The Arabidopsis CALLOSE DEFECTIVE MICROSPORE1 Gene Is Required for Male Fertility through Regulating Callose Metabolism during Microsporogenesis1[W][OPEN]. *Plant Physiol.* *164*, 1893–1904.
- Maeda, H., Song, W., Sage, T., and DellaPenna, D. (2014). Role of callose synthases in transfer cell wall development in tocopherol deficient Arabidopsis mutants. *Front. Plant Sci.* *5*.
- Nishikawa, S., Zinkl, G.M., Swanson, R.J., Maruyama, D., and Preuss, D. (2005). Callose (β -1,3 glucan) is essential for Arabidopsis pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* *5*, 22.
- Pirone-Davies, C., Prior, N., Aderkas, P. von, Smith, D., Hardie, D., Friedman, W.E., and Mathews, S. (2016). Insights from the pollination drop proteome and the ovule transcriptome of *Cephalotaxus* at the time of pollination drop production. *Ann. Bot.* mcw026.
- Piršelová, B., Mistríková, V., Libantová, J., Moravčiková, J., and Matušíková, I. (2012). Study on metal-triggered callose deposition in roots of maize and soybean. *Biologia (Bratisl.)* *67*, 698–705.
- Rhee, S.Y., and Somerville, C.R. (1998). Tetrad pollen formation in quartet mutants of Arabidopsis thaliana is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J.* *15*, 79–88.
- Ruan, Y.-L., Xu, S.-M., White, R., and Furbank, R.T. (2004). Genotypic and Developmental Evidence for the Role of Plasmodesmatal Regulation in Cotton Fiber Elongation Mediated by Callose Turnover. *Plant Physiol.* *136*, 4104–4113.
- Samuels, A.L., Giddings, T.H., and Staehelin, L.A. (1995). Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *J. Cell Biol.* *130*, 1345–1357.
- Scherp, P., Grotha, R., and Kutschera, U. (2001). Occurrence and phylogenetic significance of cytokinesis-related callose in green algae, bryophytes, ferns and seed plants. *Plant Cell Rep.* *20*, 143–149.
- Sevilem, I., Miyashima, S., and Helariutta, Y. (2013). Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants. *Cell Adhes. Migr.* *7*, 27–32.

- Sheng, X., Zhang, S., Jiang, L., Li, K., Gao, Y., and Li, X. (2012). Lead stress disrupts the cytoskeleton organization and cell wall construction during *Picea wilsonii* pollen germination and tube growth. *Biol. Trace Elem. Res.* *146*, 86–93.
- Shi, X., Sun, X., Zhang, Z., Feng, D., Zhang, Q., Han, L., Wu, J., and Lu, T. (2015a). GLUCAN SYNTHASE-LIKE 5 (GSL5) plays an essential role in male fertility by regulating callose metabolism during microsporogenesis in rice. *Plant Cell Physiol.* *56*, 497–509.
- Shi, Z.-H., Zhang, C., Xu, X.-F., Zhu, J., Zhou, Q., Ma, L.-J., Niu, J., and Yang, Z.-N. (2015b). Overexpression of AtTTP Affects ARF17 Expression and Leads to Male Sterility in Arabidopsis. *PLoS ONE* *10*.
- Speranza, A., Taddei, A.R., Gambellini, G., Ovidi, E., and Scoccianti, V. (2009). The cell wall of kiwifruit pollen tubes is a target for chromium toxicity: alterations to morphology, callose pattern and arabinogalactan protein distribution. *Plant Biol.* *11*, 179–193.
- Sun, M.-X., Huang, X.-Y., Yang, J., Guan, Y.-F., and Yang, Z.-N. (2013). Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reprod.* *26*, 83–91.
- Thiele, K., Wanner, G., Kindzierski, V., Jürgens, G., Mayer, U., Pachl, F., and Assaad, F.F. (2009). The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in Arabidopsis. *Plant J.* *58*, 13–26.
- Töller, A., Brownfield, L., Neu, C., Twell, D., and Schulze-Lefert, P. (2008). Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *Plant J.* *54*, 911–923.
- Vatén, A., Dettmer, J., Wu, S., Stierhof, Y.-D., Miyashima, S., Yadav, S.R., Roberts, C.J., Campilho, A., Bulone, V., Lichtenberger, R., et al. (2011). Callose Biosynthesis Regulates Symplastic Trafficking during Root Development. *Dev. Cell* *21*, 1144–1155.
- Verma, D.P.S. (2001). Cytokinesis and Building of the Cell Plate in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *52*, 751–784.
- Verma, D.P.S., and Hong, Z. (2001). Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* *47*, 693–701.
- Vogel, J., and Somerville, S. (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1897–1902.
- Wang, X.-T., Yuan, C., Yuan, T.-T., and Cui, S.-J. (2012). The Arabidopsis LFR Gene Is Required for the Formation of Anther Cell Layers and Normal Expression of Key Regulatory Genes. *Mol. Plant* *5*, 993–1000.
- Wawrzynska, A., Rodibaugh, N.L., and Innes, R.W. (2010). Synergistic activation of defense responses in Arabidopsis by simultaneous loss of the GSL5 callose synthase and the EDR1 protein kinase. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *23*, 578–584.
- Xie, B., and Hong, Z. (2011). Unplugging the callose plug from sieve pores. *Plant Signal. Behav.* *6*, 491–493.

Xie, B., Wang, X., and Hong, Z. (2009). Precocious pollen germination in *Arabidopsis* plants with altered callose deposition during microsporogenesis. *Planta* 231, 809–823.

Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., and Hong, Z. (2011). CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J.* 65, 1–14.

Xie, B., Deng, Y., Kanaoka, M.M., Okada, K., and Hong, Z. (2012). Expression of *Arabidopsis* callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 183, 1–8.

Yadav, S.R., Yan, D., Sevilem, I., and Helariutta, Y. (2014). Plasmodesmata-mediated intercellular signaling during plant growth and development. *Front. Plant Sci.* 5.

Yang, J., Tian, L., Sun, M.-X., Huang, X.-Y., Zhu, J., Guan, Y.-F., Jia, Q.-S., and Yang, Z.-N. (2013). AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Pollen Wall Pattern Formation in *Arabidopsis*1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* 162, 720–731.

Yousefi, N., Chehregani, A., Malayeri, B., Lorestani, B., and Cheraghi, M. (2011). Investigating the effect of heavy metals on developmental stages of anther and pollen in *Chenopodium botrys* L. (Chenopodiaceae). *Biol. Trace Elem. Res.* 140, 368–376.

The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase.

Internetové zdroje:

CALS1 callose synthase 1 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI. naposled modifikováno 03/04/2016. citováno 09/04/2016. dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/837059>.

GSL12 callose synthase 3 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI. naposled modifikováno 02/04/2016. citováno 12/04/2016. dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/831140>.

GSL07 callose synthase 7 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI. naposled modifikováno 02/04/2016. citováno 18/04/2016. dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/837160>.

GSL10 callose synthase 9 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI. naposled modifikováno 03/04/2016. citováno 19/04/2016. dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/819903>.

GSL8 glucan synthase-like 8 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)] – Gene – NCBI. naposled modifikováno 02/04/2016. citováno 21/04/2016. dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/818258>.